



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

**ESTUDO QUÍMICO DE ALCALOIDES NAS RAÍZES DE *Worsleya*
procera (Lem.) Traub (AMARYLLIDACEAE)**

KARLA LORIATTO GONRING SALARINI

VITÓRIA

2017



Karla Lorient Gonring Salarini

ESTUDO QUÍMICO DE ALCALOIDES NAS RAÍZES DE *Worsleya procera* (Lem.) Traub (AMARYLLIDACEAE)

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Espírito Santo,
como requisito para a obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas,
do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Warley de Souza Borges

VITÓRIA

2017

S161e Salarini, Karla Loriatto Gonring, 1979 -
Estudo químico de alcaloides nas raízes de *Worsleya procera* (Lem.)
Traub (Amaryllidaceae) / Karla Loriatto Gonring Salarini – 2017.
99 f. : il.

Orientador: Warley de Souza Borges.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Alcaloides de Amaryllidaceae. 2. Amaryllidaceae. I. Borges, Warley
de Souza. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
da Saúde. III. Título.

CDU: 61

Karla Lorientto Gonring Salarini

**"ESTUDO QUÍMICO DE ALCALOIDES NAS RAÍZES DE
Worsleya procera (LEM.) TRAUB (AMARYLLIDACEAE)"**

Trabalho de Dissertação de Mestrado aprovado em 31/07/2017 para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Espírito Santo

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster / UFES



Profa. Dra. Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves / UFES



Prof. Dr. Warley de Souza Borges (orientador) / UFES

Vitória

2017

AGRADECIMENTOS

À Deus pelas forças concedidas e por nortear minha vida.

Aos meus pais, Carlos e Valéria, e ao meu marido, Douglas, por todo amor, apoio e compreensão.

Ao professor Dr. Reginaldo Bezerra dos Santos pela gentileza em ceder espaço em seu laboratório para execução das análises.

Ao Dr. Jean Paulo de Andrade por sempre estar disposto a ensinar e ajudar nas atividades.

Ao Dr. Raphael Conti pelo auxílio nas análises.

À Júlia de Almeida Leite pelo suporte nas análises realizadas no laboratório de RMN do NCQP-UFES.

Aos colegas de laboratório de Produtos Naturais (Departamento de Química) pela parceria.

Ao professor Dr. Jaume Bastida pelas análises realizadas e pelo conhecimento compartilhado.

Ao professor Dr. Warley de Souza Borges pela oportunidade e orientação.

Aos professores Dr. Ricardo Machado Kuster e Dra. Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves pela participação na banca.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade.

À CAPES, CNPq e FAPES pelos subsídios destinados à pesquisa.

À SISBIO pela concessão da autorização de coleta da espécie analisada.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima”.
(Louis Pasteur)

RESUMO

Composta por mais de 1600 espécies com distribuição mundial, a família Amaryllidaceae destaca-se pela produção de alcaloides isoquinolínicos aos quais são atribuídas atividades biológicas como: antitumoral, anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e ação inibitória e reversível da enzima acetilcolinesterase. No Brasil, até o momento, foram contabilizadas 141 espécies de Amaryllidaceae, das quais 62 são endêmicas e algumas estão ameaçadas de extinção como é o caso de *Worsleya procera* (Lem.) Traub, única representante do gênero *Worsleya*. Esta espécie ocorre exclusivamente no Estado do Rio de Janeiro (RJ) e até o momento não foram encontrados estudos fitoquímicos publicados para esta espécie. Com o objetivo de realizar o estudo fitoquímico em alcaloides da espécie, foram coletadas amostras das raízes de *Worsleya procera* (Lem.) Traub na Área de Proteção Permanente da Região Serrana de Petrópolis (RJ) e após maceração e extração ácido-base obteve-se extratos enriquecidos em alcaloides. A análise preliminar por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) identificou 12 compostos já conhecidos além de outros 18 não identificados pela base de dados cedida pelo Prof. Dr. Jaume Bastida da Universidade de Barcelona. Empregando-se técnicas cromatográficas, espectroscópicas e espectométricas isolou-se e identificou-se os alcaloides licorina, tazetina, 3-epimacronina, homolicorina, albomaculina, ismina e trisfaeridina. As raízes de *Worsleya procera* são uma rica fonte de alcaloides, especialmente de licorina e tazetina. A identificação destes compostos pode contribuir para quimiotaxonomia da espécie bem como em pesquisas envolvendo atividades biológicas devido à quantidade de alcaloides isolados.

Palavras - chave: Alcaloides isoquinolínicos. Amaryllidaceae. *Worsleya*.

ABSTRACT

Comprising more than 1600 species worldwide, the Amaryllidaceae family is distinguished by the production of isoquinolinic alkaloids which are assigned biological activities such as: antitumor, anti-inflammatory, analgesic, antimicrobial and reversible acetylcholinesterase inhibitory action. In Brazil, 141 species of Amaryllidaceae have been described, of which 62 are endemic and some are threatened of extinction, as is the case of *Worsleya procera* (Lem.) Traub, the only representative of the genus *Worsleya*. This species occurs exclusively in the State of Rio de Janeiro (RJ) and no published phytochemical studies have been found for this species. In order to carry out the phytochemical study on alkaloids of the species, samples of the roots of *Worsleya procera* (Lem.) Traub were collected in the Permanent Protection Area of Petrópolis (RJ) and after maceration and acid-base extraction, extracts enriched in alkaloids were obtained. Preliminary analysis by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (CG-MS) identified 12 compounds already known, as well as other 18 non-identified by the University of Barcelona database. Using chromatographic, spectroscopic and spectrometric techniques, it was possible to isolate and identify the alkaloids lycorine, tazettine, 3-epimacronine, homolycorine, albomaculine, ismine and trisphaeridine. The roots of *Worsleya procera* are a rich source of alkaloids, especially of lycorine and tazettine. The identification of these compounds may contribute to chemotaxonomy of this species as well as in research involving biological activities due to the amount of isolated alkaloids.

Keywords: Isoquinolinic alkaloids. Amaryllidaceae. *Worsleya*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de algumas substâncias isoladas de origem natural ...	16
Figura 2 - Estrutura química da galantamina	16
Figura 3 - Exemplares de <i>Worsleya procera</i> (Lem.) Traub	17
Figura 4 - Distribuição mundial da família Amaryllidaceae	18
Figura 5 - Algumas espécies pertencentes à família Amaryllidaceae	19
Figura 6 - <i>Worsleya procera</i> em seu <i>habitat</i> natural	20
Figura 7 - Plântulas de <i>Worsleya procera</i> sobre musgo	21
Figura 8 - Prancha botânica de <i>Worsleya procera</i> (Lem.) Traub	23
Figura 9 - Principais etapas da biossíntese da norbeladina	25
Figura 10 - Metilação da norbeladina e esqueletos básicos formados	26
Figura 11 - Detecção de alcaloides através do uso do reagente de Dragendorff	32
Figura 12 - Obtenção dos extratos enriquecidos com alcaloides	34
Figura 13 - Fracionamento de WPR-H	37
Figura 14 - Obtenção das subfrações de WPR-H 1-16 (A)	39
Figura 15 - Obtenção das subfrações de WPR-H 17-36 (B)	40
Figura 16 - Obtenção das subfrações de WPR-H 37-136 (C)	43
Figura 17 - Obtenção das subfrações de WPR-H 137-176 (D)	45
Figura 18 - Fracionamento de WPR-AcB	47
Figura 19 - Obtenção das subfrações de WPR-AcB 3-13 (E)	48
Figura 20 - Obtenção das subfrações de WPR-AcB 19-25 (G)	49
Figura 21 - Obtenção das subfrações de WPR-AcB 26-27 (H)	51
Figura 22 - Obtenção das subfrações de WPR-AcB 28-33 (I)	53
Figura 23 - Principais fragmentos de alcaloides do esqueleto tipo homolicorina	55
Figura 24 - Principais fragmentos de alcaloides do esqueleto tipo haemantamina ...	57

Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H do composto 1	63
Figura 26 - Estrutura química do alcaloide licorina	64
Figura 27 - Estrutura química do alcaloide assoanina	65
Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H do composto 2	67
Figura 29 - Estrutura química do alcaloide trisfaeridina	68
Figura 30 - Espectro de RMN de ^1H do composto 3	71
Figura 31 - Estrutura química do alcaloide tazetina	72
Figura 32 - Estrutura química do alcaloide pretazetina	73
Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H do composto 4	76
Figura 34 - Deconvolução do sinal em 3,18 ppm para o composto 4	77
Figura 35 - Estrutura química do alcaloide 3-epimacronina	77
Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H do composto 5	80
Figura 37 - Estrutura química do alcaloide homolicorina	81
Figura 38 - Estruturas químicas de derivados de homolicorina.....	81
Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H do composto 6	83
Figura 40 - Estrutura química do alcaloide albomaculina	84
Figura 41 - Espectro de RMN de ^1H do composto 7	87
Figura 42 - Estrutura química do alcaloide ismina	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais características botânicas de <i>Worsleya procera</i>	22
Tabela 2 - Esqueleto básico e numeração dos anéis	27
Tabela 3 - Fases móveis adotadas no fracionamento de WPR-H.....	36
Tabela 4 - Fases móveis adotadas no fracionamento de WPR-H 1-16 (A).....	38
Tabela 5 - Fases móveis adotadas no fracionamento de WPR-H 17-36 (B).....	40
Tabela 6 - Fases móveis adotadas no fracionamento de WPR-H 37-136 (C).....	41
Tabela 7 – Dados do fracionamento das subfrações C ₁ e C ₄ de WPR-H 37-136	42
Tabela 8 - Fases móveis adotadas no fracionamento de WPR-H 137-176 (D).....	44
Tabela 9 - Fases móveis adotadas no fracionamento de WPR-AcB.....	46
Tabela 10 - Fases móveis adotadas no fracionamento de WPR-AcB 26-27 (H).....	50
Tabela 11- Dados do fracionamento das subfrações I ₃ , I ₅ e I ₆ de WPR-AcB 28-33..	52
Tabela 12 - Dados de CG-EM das raízes de <i>Worsleya procera</i>	56
Tabela 13 - Taxa de recuperação cromatográfica.....	58
Tabela 14 - Dados dos alcaloides isolados	59
Tabela 15 - Dados comparativos do espectro de RMN de ¹ H para o composto 1	62
Tabela 16 - Dados comparativos do espectro de RMN de ¹ H para o composto 2	68
Tabela 17 - Dados comparativos do espectro de RMN de ¹ H para o composto 3	72
Tabela 18 - Dados comparativos do espectro de RMN de ¹ H para o composto 4	77
Tabela 19 - Dados comparativos do espectro de RMN de ¹ H para o composto 5	79
Tabela 20 - Dados comparativos do espectro de RMN de ¹ H para o composto 6	84
Tabela 21 - Dados comparativos do espectro de RMN de ¹ H para o composto 7	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - percentual

~ - aproximadamente

∫ - integral

AcOEt - Acetato de etila

APA - Área de Proteção Ambiental

APP - Áreas de Proteção Permanente

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CCDP – Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CD₃OD – Metanol deuterado

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

CE – Cromatografia por Exclusão

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CLC – Cromatografia Líquida em Coluna

CLV – Cromatografia Líquida a Vácuo

cm - centímetros

δ - deslocamento químico

d – dubleto

dd – duplo dubleto

ddd – duplo duplo dubleto

dt – duplo tripleto

DEPT - *Distortionless enhancement by polarization transfer*

DMSO – D₆ – Dimetilsulfóxido deuterado

Et₂O – Éter dietílico

eV – elétron volt

g - gramas

gem - geminal

H – hidrogênio

H₂O - água

Hex - hexano

Hz - Hertz

J - constante de acoplamento

l – largo

L-Phe - *L*-fenilalanina

L-Tyr - *L*-tirosina

M^+ - íon molecular

m – metro

m – multiplete

MeOH - metanol

mg - miligramas

MHz - Mega-Hertz

min - minuto

MTT - Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]

mL – mililitros

m/z – relação massa/carga

NH₄OH - hidróxido de amônio

nm – nanômetro

NMe – N-metila

OCH₂O - Phe - metilenodioxifenila

OMe – metoxila

ppm - parte por milhão

q - quarteto

ReBio - Reserva Biológica

RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s – singleto

t - tripleto

TIC - *Total ion count*

UV - ultravioleta

vic - vicinal

WPR-AcA - Extrato acetato de etila ácido de *Worsleya procera*

WPR-AcB - Extrato acetato de etila básico de *Worsleya procera*

WPR-AcMeOH - Extrato acetato de etila-metanol de *Worsleya procera*

WPR-H - Extrato hexânico de *Worsleya procera*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	ASPECTOS BOTÂNICOS	17
1.1.1	Família Amaryllidaceae	17
1.1.2	<i>Worsleya procera</i>	19
1.2	ASPECTOS QUÍMICOS	23
1.2.1	Alcaloides de Amaryllidaceae	23
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVOS GERAIS	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	MATERIAIS	30
3.1.1	Solventes e reagentes	30
3.1.2	Consumíveis	30
3.1.3	Equipamentos	31
3.2	MÉTODOS	31
3.2.1	Coleta da planta	31
3.2.2	Preparação do extrato bruto das raízes	31
3.2.3	Preparação dos extratos enriquecidos com alcaloides	32
3.2.4	Análise exploratória de alcaloides	35
3.2.4.1	Metodologia	35
3.2.5	Fracionamento cromatográfico, purificação e isolamento dos alcaloides	35
3.2.5.1	Extrato WPR-H (extrato hexânico)	35
3.2.5.1.1	<i>Fracionamento de WPR-H 1-16 (A)</i>	37
3.2.5.1.2	<i>Fracionamento de WPR-H 17-36 (B)</i>	39

3.2.5.1.3	<i>Fracionamento de WPR-H 37-136 (C)</i>	41
3.2.5.1.4	<i>Fracionamento de WPR-H 137-176 (D)</i>	42
3.2.5.2	Extrato WPR-AcB (extrato acetato de etila básico)	45
3.2.5.2.1	<i>Fracionamento de WPR-AcB 3-13 (E)</i>	47
3.2.5.2.2	<i>Fracionamento de WPR-AcB 19-25 (G)</i>	48
3.2.5.2.3	<i>Fracionamento de WPR-AcB 26-27 (H)</i>	49
3.2.5.2.4	<i>Fracionamento de WPR-AcB 28-33 (I)</i>	51
3.2.5.3	Extrato WPR-AcMOH	54
3.2.5.4	Extrato WPR-AcA	54
3.2.6	Identificação dos alcaloides por RMN-¹H	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	ANÁLISE EXPORATÓRIA (CG-EM)	55
4.2	TAXA DE RECUPERAÇÃO CROMATOGRÁFICA	57
4.3	RENDIMENTO E COMPOSTOS ISOLADOS	59
4.3.1	Composto 1	61
4.3.2	Composto 2	66
4.3.3	Composto 3	69
4.3.4	Composto 4	74
4.3.5	Composto 5	78
4.3.6	Composto 6	82
4.3.7	Composto 7	85
5	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	90

1 – INTRODUÇÃO

Dentre os reinos existentes, Plantae é o principal contribuinte de metabólitos secundários, compostos de ocorrência restrita a grupos taxonômicos não envolvidos na manutenção da vida em nível celular, mas com participação na interação entre as células e com o meio no qual o organismo está inserido (YUNES, CECHINEL FILHO, 2001; VERPOORTE, ALFERMANN, 2000; BARREIRO, BOLZANI, 2009).

Além de desempenharem importante papel na adaptação das espécies aos diferentes ambientes, esses compostos possuem amplas atividades biológicas, razão pela qual a medicina popular emprega, há séculos, plantas no tratamento das mais variadas moléstias (BOURGAUD et al., 2001; DIAS, et al., 2012; HARVEY, et al., 2015).

Muito do conhecimento popular relacionado às plantas medicinais passou de geração em geração, porém o isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal ocorreu entre os séculos XVIII e XIX. Os trabalhos daquela época se caracterizaram, principalmente, pela extração e isolamento de ácidos orgânicos e de alcaloides (MONTANARI, BOLZANI, 2001). A morfina e quinina (Figura 1), isoladas de *Papaver somniferum* e *Cinchona calisaya*, respectivamente, se consagraram como fármacos eficazes empregados no tratamento de algumas doenças até os dias atuais (CECHINEL FILHO, YUNES, 1998; MONTANARI, BOLZANI, 2001). Em 1897, Felix Hoffman sintetizou o ácido acetilsalicílico, princípio ativo da Aspirina®, a partir da salicina (Figura 1), produto natural isolado de *Salix alba* (salgueiro). Este fato foi um marco nas pesquisas envolvendo produtos naturais (BRAGA, CASTILHO, 2011).

O desenvolvimento da química e da tecnologia aliados ao empenho de cientistas proporcionaram um aumento considerável nas pesquisas de produtos naturais, o que é constatado pelo número crescente de publicações ao longo dos últimos anos. Entretanto, ainda existem muitas espécies vegetais a serem estudadas (ORTHOLAND, GANESAN, 2004; JIN, 2016; NEWMAN, CRAGG, 2016).

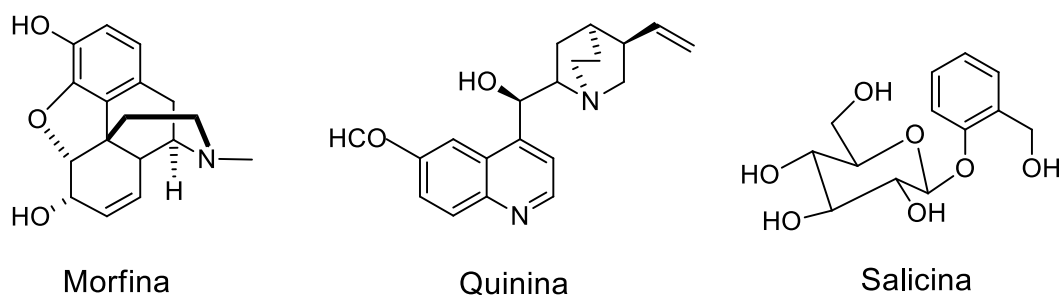


Figura 1: Estrutura química das substâncias isoladas de origem natural.

Inicialmente identificada por Jaume Saint-Hilaire em 1805 e atualmente composta por mais de 1600 espécies com distribuição mundial, a família Amaryllidaceae é uma das 20 famílias de plantas medicinais mais utilizadas no tratamento de diversas doenças (DUTILH et al., 2013). Destacam-se pela produção de alcaloides isoquinolínicos a partir dos aminoácidos fenilalanina e tirosina (GURIB-FAKIM, 2006; BASTIDA et al., 2011). Esta classe de alcaloides tem se mostrado especialmente efetiva em suas atividades biológicas, como a galantamina (Figura 2), isolada pela primeira vez da espécie *Galanthus woronovi* em 1952 (IRWIN, SMITH, 1960; HARVEY, 1995) e posteriormente empregada no tratamento da Doença de Alzheimer por sua atividade inibitória e reversível da enzima acetilcolinesterase (MAELICKE et al., 2001).

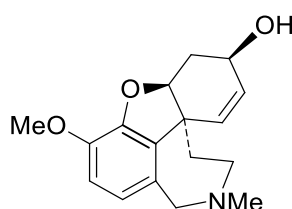


Figura 2: Estrutura química da galantamina.

Atividades antiparasitária, antitumoral, antiviral, anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana também foram atribuídas a este grupo molecular (NOZAKI et al., 1989; TANKER et al., 1996; ŞENER et al., 2003; ELGORASHI, VAN STADEN, 2004; SZLAVIK et al., 2004; ELDEEN et al., 2005; EVIDENTE, et al., 2009; OSORIO et al., 2010; CHEESMAN, et al., 2012; NAIR et al., 2012; SONG et al., 2014; LIU et al., 2015). Por esta razão, o interesse no isolamento destes compostos a partir de espécies de Amaryllidaceae é grande e, de acordo com Jin (2016), mais de 500 alcaloides já foram isolados.

Segundo dados do grupo de pesquisa do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (2017), o Brasil possui flora composta por mais de 46 mil espécies de plantas e abriga a maior biodiversidade do planeta. Até o momento, foram contabilizadas 141 espécies de Amaryllidaceae, das quais 62 endêmicas e muitas ameaçadas de extinção, como é o caso da *Worsleya procera* (Lem.) Traub (Figura 3), única representante do gênero *Worsleya* (DUTILH et al., 2013; DUTILH, OLIVEIRA, 2015).



Figura 3: Exemplos de *Worsleya procera* (Lem.) Traub (Fotos: Orlando Graeff – reprodução autorizada pelo autor).

Até o momento, não foram encontrados registros na literatura sobre o estudo fitoquímico dessa espécie, o que torna esta pesquisa relevante, uma vez que os alcaloides da família Amaryllidaceae possuem elevado potencial farmacológico.

1.1 – ASPECTOS BOTÂNICOS

1.1.1 – Família Amaryllidaceae

Pertencente à ordem Asparagales das monocotiledôneas, a família Amaryllidaceae, encontra-se distribuída mundialmente (Figura 4). Há uma grande concentração de espécies na África do Sul e em alguns países da América do Sul e, por isso, estes lugares são considerados centros de diversificação primária e secundária, respectivamente (BASTIDA, et al., 2011; JIN, 2016).



Figura 4: Distribuição mundial da família Amaryllidaceae (ANGIOSPERM PHYLOGENY WEBSITE, 2016).

Algumas espécies possuem distribuição geográfica muito restrita enquanto outras podem ser encontradas em matas, campos, montanhas, restingas, brejos e sobre pedras, em geral associadas a uma vegetação herbácea (DUTILH et al., 2013).

Esta família sofreu uma reclassificação taxonômica em 2009 quando Chase, Reveal e Fay incorporaram as famílias Alliaceae e Agapanthaceae à Amaryllidaceae e instituíram três novas subfamílias: Allioideae, Agapanthoideae e Amaryllidoideae. Entretanto, ainda é comum se referir às espécies da subfamília Amaryllidoidea como Amaryllidaceae.

Os membros desta família são ervas perenes ou bienais, eretas, bulbosas com bulbos subterrâneos ou superficiais, colo curto e alongado formado pela bainha das folhas (Figura 5) que são, geralmente, senescentes na época de floração, filiformes, eretas a oblíquas, lineares a orbiculares, ascendentes, lâminas paralelinérveas, glabras com estômatos anomocíticos e células mucilaginosas ou sacos alongados com ráfides. A inflorescência é umbeliforme, raramente uniflora, com haste cheia ou fistulosa, com brácteas na região distal (DAHLGREN et al., 1985; DUTILH, 2005).

As flores são bissexuadas, actinomorfas ou zigomorfas, conspicuas ou não, pediceladas, raramente sésseis, possuem seis tépalas petalóides, dois verticilos, anteras alongadas, unidas na base em um tubo nectarífero muito curto a longo, cinco a seis estames, ovário súpero ou ínfero, óvulos (de um a muitos por lóculo), estilete simples, fistuloso, estigma simples a trifido (DAHLGREN et al., 1985; DUTILH, 2005).

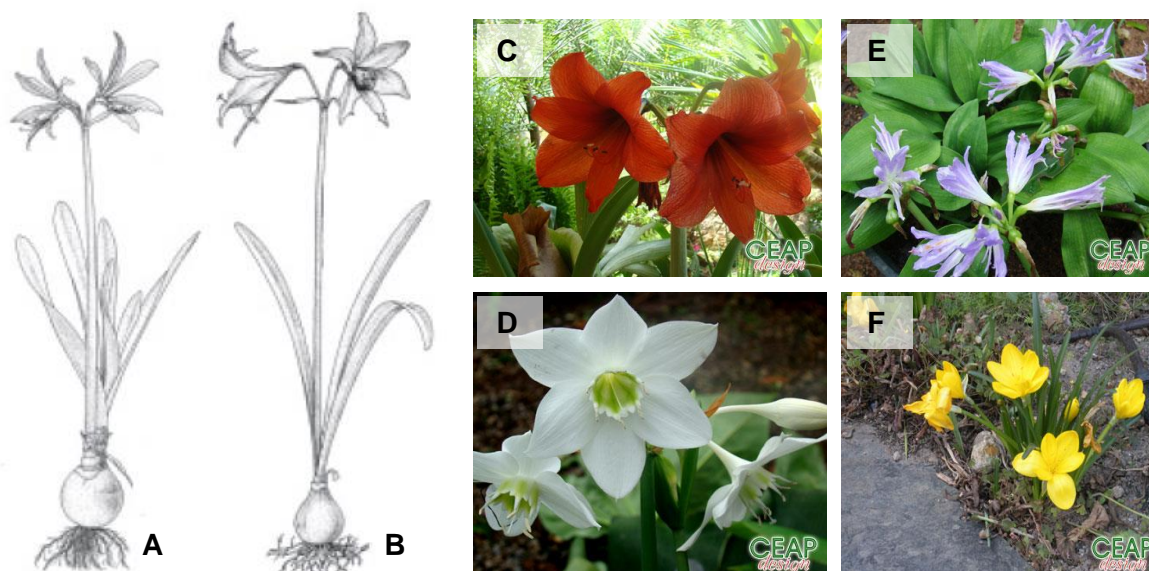


Figura 5: Algumas espécies pertencentes à família Amaryllidaceae. Ilustração botânica de **A-***Hippeastrum morelianum* e **B-***Hippeastrum blossfeldiae* (DUTILH, 2005). Fotos de **C-***Hippeastrum hybridum*; **D-***Eucharis grandiflora*; **E-***Griffinia espiritensis*; **F-***Sternbergia lútea* (Fotos: José Barbosa Sodré – reprodução autorizada pelo autor).

Apresentam fruto cápsula com poucas a muitas sementes por lóculo. As sementes são globosas, irregularmente poliédricas, aplanadas, aladas, com ou sem arilo, geralmente escuras a pretas devido à presença de uma camada externa de fitomelanina. Embrião cilíndrico reto, endosperma presente (DUTILH, 2005).

1.1.2 – *Worsleya procera*

Popularmente conhecida como Imperatriz do Brasil, Amarílis azul ou Rabo-de-galo, esta espécie é a única representante do gênero *Worsleya*. O nome *Worsleya* é dedicado à Arthington Worsley (1861-1943) que estudou a planta em seu ambiente. A espécie passou por diversas classificações taxonômicas (Quadro 1) até ser classificada como *Worsleya procera* (Lem.) Traub (DUTILH, OLIVEIRA, 2015). No entanto, os poucos trabalhos publicados ainda se referem à espécie como *Worsleya rayneri*.

Quadro 1 - Sinônimos relevantes de *Worsleya procera*

Basinômio	<i>Hippeastrum procerum</i> Lem.
Heterotípico	<i>Amaryllis rayneri</i> Hook. f.
Heterotípico	<i>Worsleya raineri</i> (Hook.) Traub & Moldenke
Heterotípico	<i>Worsleya rayneri</i> (Hook. f.) Traub & Moldenke

Fonte: Dutilh, Oliveira (2015).

É endêmica do Brasil e ocorre exclusivamente no Estado do Rio de Janeiro em Áreas de Proteção Permanente (APP) dentro dos limites da Área de Proteção Ambiental da Região Serrana de Petrópolis (APA Petrópolis) e na Reserva Biológica Estadual de Araras (ReBio Araras) (Figura 6A) (MARTINELLI, 1984; DUTILH et al., 2013).

Planta herbácea, rupícola ou saxícola. Cresce na face de encostas rochosas expostas ao sol e a fortes ventos. Acumula material orgânico proveniente de detritos carregados pelas chuvas das partes mais altas, porém é possível encontrar espécies desprovidas destes substratos (MARTINELLI, 1984). Desenvolve-se em ambientes xerófitos em altitudes superiores a 1.000 m, forma ilhas de vegetação e vive em comunidade com diversas espécies de Bromeliaceae, Gramineae entre outras, além de um número razoável de líquens e musgos (Figura 6B e C) (MARTINELLI, 1984; DE MORAES, 2009).

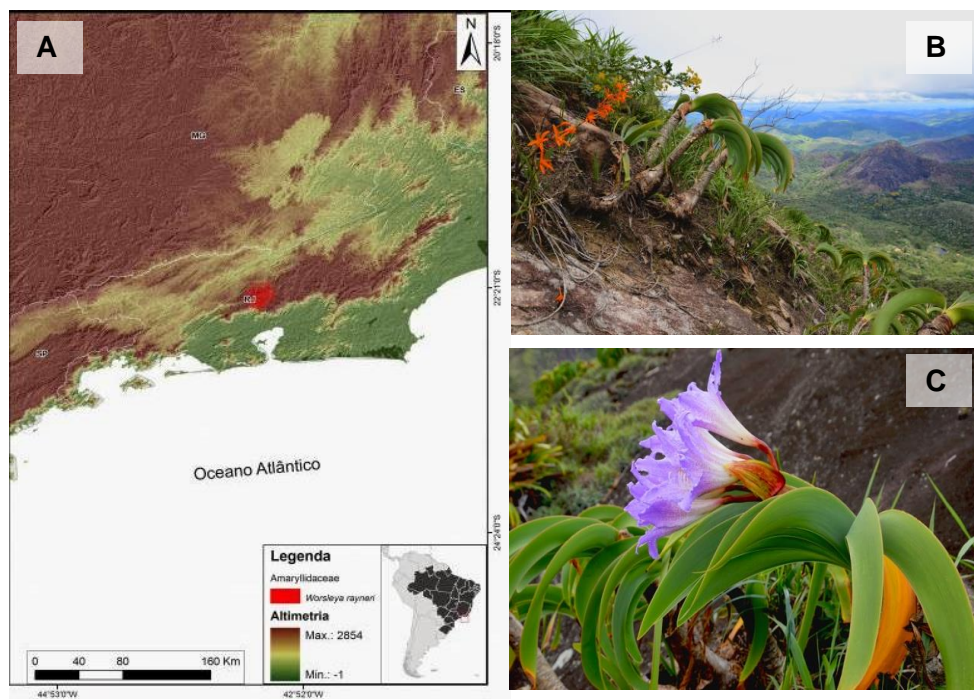


Figura 6: *Worsleya procera* em seu *habitat* natural. **A** – Localização das espécies de *Worsleya procera* (DUTILH et al., 2013); **B e C** – Exemplos de *Worsleya procera* em seu *habitat* natural (Fotos: Orlando Graeff – reprodução autorizada pelo autor).

Esta espécie encontra-se na lista de espécies ameaçadas de extinção (classificação EM – em perigo de extinção), devido à redução de suas subpopulações atribuída, principalmente, aos incêndios na região e à remoção ilegal de exemplares para comercialização, uma vez que é considerada rara e atrai a atenção de colecionadores, pois sua aparência é inusitada e suas flores vistosas. Essa retirada provoca mudanças microclimáticas e favorece à invasão de outras espécies que ocupam e destroem a vegetação natural, inclusive da *Worsleya procera* (MARTINELLI, 1984; MARTINELLI, DE MORAES, 2007; DE MORAES, 2009; DUTILH et al., 2013; BRASIL, 2014; DUTILH, OLIVEIRA, 2015).

De Moraes (2009) observou durante suas pesquisas que esta espécie apresenta boa capacidade de regeneração, pois possui grande quantidade de mucilagem, bulbo alongado e hábito clonal, características que contribuem para a perpetuação da espécie após a incidência de fatores de declínio populacional. No entanto, o tempo de geração estimado é de 5 a 10 anos (Figura 7) (DE MORAES, 2009; DUTILH, 2013).



Figura 7: Plântulas de *Worsleya procera* sobre musgo em local onde ocorrera incêndio (Foto: Orlando Graeff – reprodução autorizada pelo autor).

Uma das principais formas de preservar esta espécie é a conservação *in-situ*, ou seja, proteção de seu *habitat*. A conservação *ex-situ*, também é importante, desde que realizada por instituições científicas, que possam desenvolver pesquisas voltadas para a propagação (MARTINELLI, DE MORAES, 2007).

A Tabela 1 apresenta as principais características botânicas de *Worsleya procera* e a prancha botânica encontra-se representada na Figura 8.

TABELA 1 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DE *Worsleya procera*.

Parte da planta	Características	Dimensões		
		Comprimento	Largura	Diâmetro
Bulbo	Delgado, revestimento escamoso, coloração castanha afilando em direção ao ápice.	0,5 a 1,5 m	-	13 a 15 cm acima das raízes
Folhas	Dísticas, falcadas, orientadas em uma única direção, subcarnosas com linha marginal alva.	1 m	4,8 a 7,5 cm na porção mediana	-
Pendúnculo	Longo, achatado, com duas margens crescendo no ápice do bulbo.	40 cm	2 a 5 cm	-
Espata	Quatro: duas externas e duas internas (mais estreitas).	Externas: 15 a 17 cm Internas: 7,5 a 10 cm	Externas: 3 a 5 cm	-
Pedicelos	Trigonal.	7 a 8 cm	-	-
Ovário	Muitos óvulos.	1,3 a 1,5 cm	-	-
Inflorescência	Tipo umbela com 4 a 14 flores vistosas de coloração lilás ou rósea.	14 a 16 cm	-	-
Tépalos	Lanceolados e agudos. Tubo dos tépalos muito curto.	12 a 15 cm	3 cm	-
Anteras	Albo-amareladas.	-	-	-
Estigma	Capitado ou trilobado.	-	-	-
Fruto	Tipo cápsula loculicida com três valvas.	8 a 11 cm	5 a 7 cm	-
Sementes	Planas, subarredondadas e nigrescentes.	-	-	-

Fonte: Adaptado de Martinelli (1984).

Esta espécie é diferente das demais pertencentes à família Amaryllidaceae, visto que apresenta algumas particularidades como isolamento geográfico, grande quantidade de mucilagem, bulbo aéreo, número de espatas igual a quatro e é desprovida de paraperigônio, o que sugere uma linha evolutiva independente dentro da Amaryllidaceae (MARTINELLI, 1984; DUTILH et al., 2013).

Este fato foi reforçado pelas pesquisas realizadas por Merrow e colaboradores (1999) que ao utilizarem a sistemática de classificação baseada na análise cladística de plastídio *rbcl* e *trnL-F* tiveram dificuldade em classificar a espécie. Por esses motivos, ela é considerada um paleoendemismo das formações campestres de altitude do Estado do Rio de Janeiro e encontra um paralelo somente com espécies

do gênero *Griffinia* com a qual compartilha maiores afinidades morfológicas (MERROW, 1999; DUTILH, 2005).



Figura 8: Prancha botânica de *Worsleya procera* (Lem.) Traub (Adaptado de SOUZA, 2012).

1.2 – ASPECTOS QUÍMICOS

1.2.1 – Alcaloides de Amaryllidaceae

Alcaloides são uma classe de metabólito secundário, biossintetizado principalmente por plantas, que apresenta nitrogênio em sua composição proveniente do metabolismo dos aminoácidos (HENRIQUES et al., 2004; GURIB-FAKIM, 2006). A quantidade produzida destes compostos pode variar dependendo, basicamente, do

grau de desenvolvimento da planta, de sua localização, da época do ano e da composição do solo (CODINA et al., 1993).

Segundo Wink (1988) a biossíntese de alcaloides ocorre quando a planta é exposta a diversos fatores como o predatismo. Hartmann (2007) observou que a concentração destes compostos era maior em partes da planta mais suscetíveis aos ataques de herbívoros, uma vez que possuem gosto amargo e propriedades repelentes e tóxicas.

Esses compostos são facilmente encontrados nas angiospermas dicotiledôneas, porém ocorrem em famílias de monocotiledôneas como Colchicaceae e Amaryllidaceae (GURIB-FAKIM, 2006). Esta distribuição restrita de alcaloides dentro das famílias botânicas constitui a base para quimiotaxonomia e ecologia química (BOURGAUD et al., 2001).

Os alcaloides encontrados na família Amaryllidaceae, especialmente, na subfamília Amaryllidoideae, são do tipo isoquinolínicos e a maioria não é encontrada em outras famílias (BASTIDA et al., 2011). Muitos destes compostos, como licorina, homolicorina, galantamina, narciclasina, crinina e seus derivados, possuem alto potencial farmacológico e, portanto, são alvo de diversos estudos biológicos (KILGORE, KUTCHAN, 2016).

Também denominados “alcaloides de Amaryllidaceae”, esta classe de compostos é biossintetizada a partir dos aminoácidos *L*-fenilalanina (*L*-Phe) e *L*-tirosina (*L*-Tyr), provenientes da via do ácido chiquímico. Reações de eliminação, β -oxidação, condensação e redução promovidas por enzimas produzem o intermediário chave da biossíntese dos alcaloides, a norbeladina (BASTIDA et al., 2011; JIN, 2016; KILGORE, KUTCHAN, 2016).

A estrutura básica deste composto pode ser representada como C₆-C₁-N-C₂-C₆. Diversos estudos mostraram que *L*-Phe atua como precursor primário do fragmento C₆-C₁ correspondente ao anel A e à posição benzílica α em relação ao nitrogênio da norbeladina. Já *L*-Tyr é precursor do fragmento C₆-C₂-N correspondente ao anel C,

dois carbonos da cadeia lateral e o nitrogênio (heteroátomo) (Figura 9) (BASTIDA et al., 2011; KILGORE, KUTCHAN, 2016).

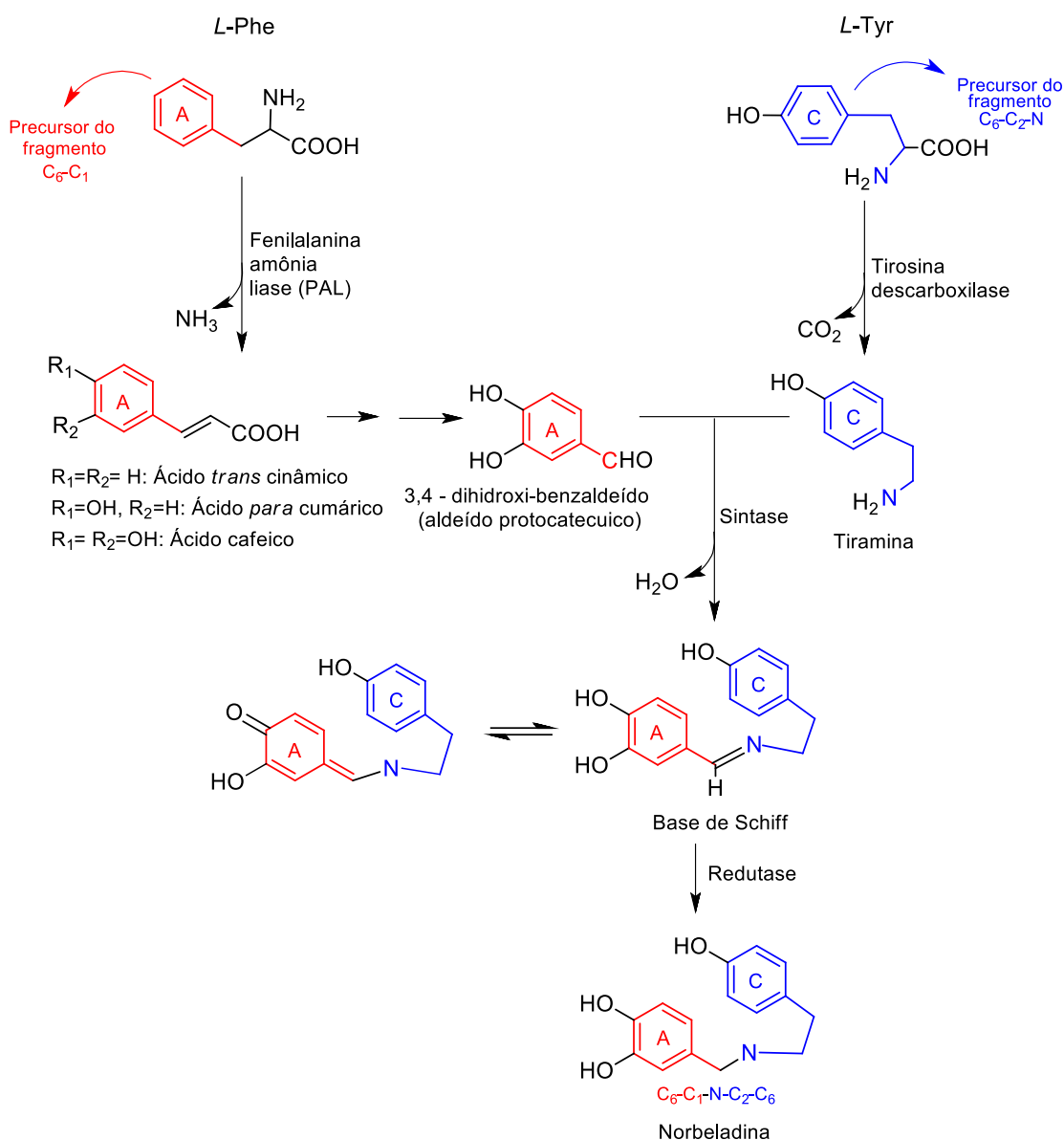


Figura 9: Principais etapas da biossíntese da norbeladina (Adaptado de Bastida et al., 2011; KILGORE, KUTCHAN, 2016).

A norbeladina sofre uma metilação na posição 4' resultando na 4'-O-metilnorbeladina, considerada precursor universal dos alcaloides isoquinolínicos (BASTIDA et al., 2006). Nesta posição o anel A é protegido da oxidação e proporciona diferentes possibilidades de acoplamento oxidativo fenólico intramolecular: *orto-para'*, *para-para'* e *para-orto'* (BASTIDA et al., 2006, JIN, 2016; KILGORE, KUTCHAN, 2016).

Os esqueletos resultantes podem ser classificados em nove tipos principais (licorina, homolicorina, crinina, haemantamina, tazetina, narciclasina, montamina e galantamina) a partir dos quais outros alcaloides isoquinolínicos são biossintetizados (Figura 10) (BASTIDA et al., 2006; ÜNVER, 2007; KILGORE; KUTCHAN, 2016).

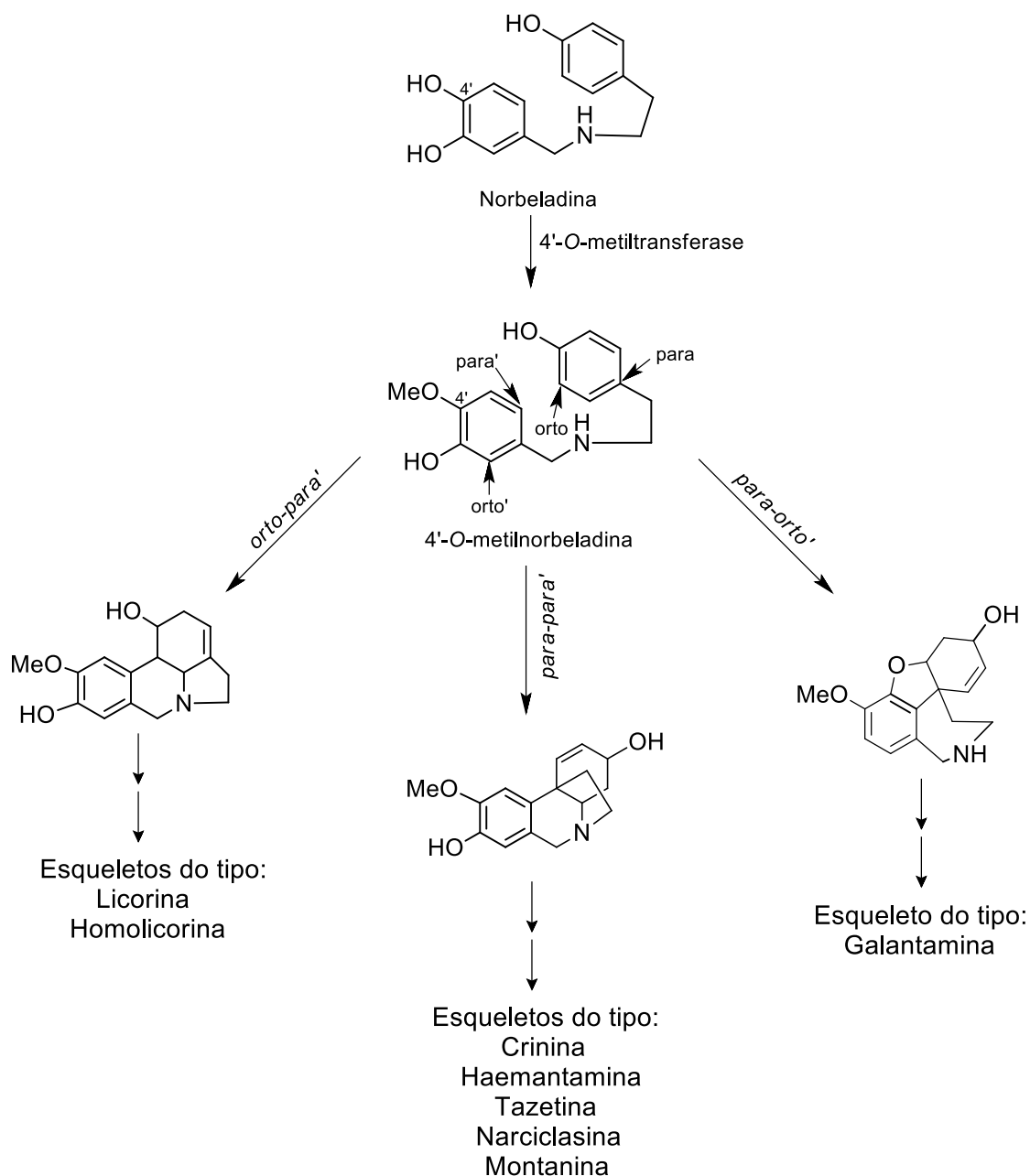


Figura 10: Metilação da norbeladina e esqueletos básicos formados através dos diferentes acoplamentos oxidativos fenólicos (Adaptado de Bastida et al., 2011).

Na literatura observam-se outras classificações de esqueletos dos alcaloides de Amaryllidaceae, como a proposta por Jin (2016). Todas são embasadas nas vias

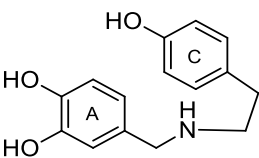
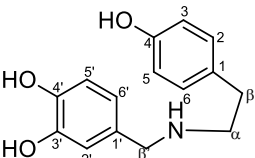
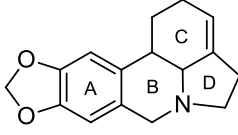
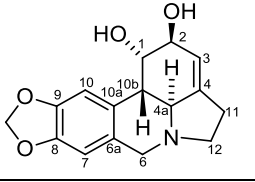
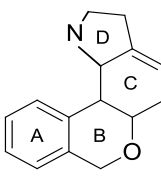
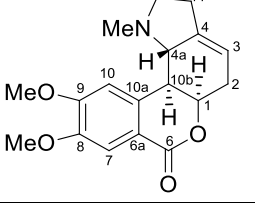
biossintéticas, porém com diferenças nas interpretações, uma vez que ainda não foram esclarecidas todas as vias envolvidas na produção dos diferentes tipos de alcaloides isoquinolínicos isolados e identificados até o momento. Da mesma forma, a sistemática de numeração destes alcaloides ainda não é um consenso entre os autores.

A sistemática de numeração adotada neste trabalho foi proposta por Ghosal e colaboradores (1985) a fim de facilitar o estudo comparativo entre as diferentes estruturas dos alcaloides isoquinolínicos isolados ao longo dos anos.

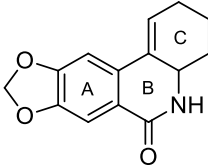
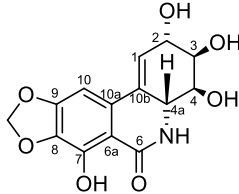
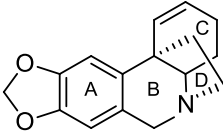
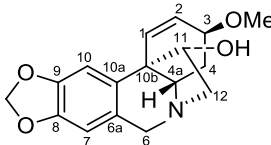
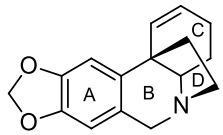
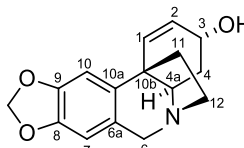
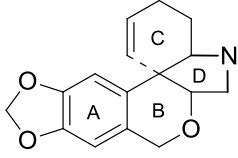
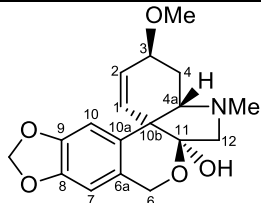
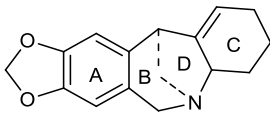
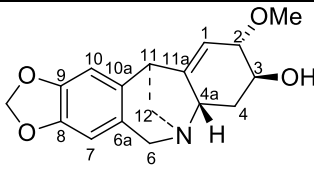
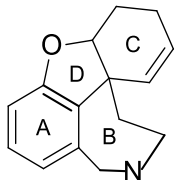
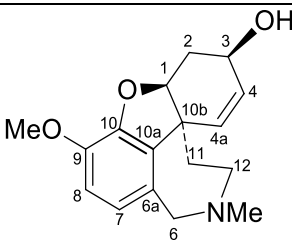
Desta forma, o anel A deve possuir a mesma numeração em todas as estruturas, independente do tipo de esqueleto, com exceção do alcaloide do tipo norbeladina que apresenta o caractere (') ao lado de cada número do anel (DE ANDRADE, 2014). Já o anel C, deve ser numerado no sentido horário, exceto nos alcaloides do tipo homolicorina por razões biossintéticas (DE ANDRADE, 2014). A posição benzílica ou α em relação ao heteroátomo é considerada posição 6 e a posição livre mais próxima do nitrogênio do anel pirrolidínico é considerada a posição 12 (Tabela 2) (DE ANDRADE, 2014). Os anéis B e D são resultados dos acoplamentos oxidativos fenólicos (BASTIDA et.al., 2006).

TABELA 2 – ESQUELETOS TIPO E NUMERAÇÃO DOS ANÉIS

(continua)

Grupo estrutural	Esqueleto básico	Relação dos anéis	Numeração e estrutura dos anéis
<i>N</i> -benzil- <i>N</i> -feniletilamina	Norbeladina		
Pirrol[d,e] fenantridina	Licorina		
2-benzopirano [3,4-g] indol	Homolicorina		

(conclusão)

Grupo estrutural	Esqueleto tipo	Relação dos anéis	Numeração e estrutura dos anéis
Fenantridina	Narciclasina		
5,10b-etano-fenantridina (crinano)	Haemantamina (ponte em α)		
	Crinina (ponte em β)		
2-benzopirano [3,4-c]indol	Tazetina		
5,11-metano-morfantridina	Montanina		
Dibenzofurano	Galantamina		

Fonte: Adaptado de De Andrade (2014).

2 - OBJETIVOS

2.1 – GERAL

Realizar o estudo químico dos alcaloides das raízes de *Worlseyia procera* (Lem.) Traub.

2.2 – ESPECÍFICOS

Determinar a melhor metodologia para o fracionamento dos extratos;

Determinar o rendimento de alcaloides nos extratos obtidos;

Extrair e purificar os alcaloides presentes nas frações obtidas;

Identificar os alcaloides isolados através da comparação dos resultados com os disponíveis na literatura.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

3.1.1 - Solventes e reagentes

Solventes grau analítico (p.a.): acetato de etila (AcOEt), éter dietílico (Et₂O) metanol (MeOH), acetona (Me₂CO), clorofórmio (CHCl₃), diclorometano (CH₂Cl₂) e hexano (Hex) de diferentes marcas comerciais.

Reagentes analíticos: sulfato de sódio anidro, hidróxido de amônio 25% (NH₄OH), ácido sulfúrico (H₂SO₄), reagente de Dragendorff (subnitrato básico de bismuto, ácido acético glacial, iodeto de potássio, água destilada).

Solventes deuterados (destinados às análises por ressonância magnética nuclear de hidrogênio – RMN de ¹H): metanol (CD₃OD) e clorofórmio (CDCl₃) da marca Sigma Aldrich.

3.1.2 – Consumíveis

- Cromatofolhas de alumínio 0,20 mm recobertas com sílica gel 60 G/UV 254 da marca Macherey-Nagel (20 x 20 cm) para realização de cromatografia em camada delgada (CCD).
- Cromatoplasmas de vidro 0,25 mm recobertas com sílica gel 60 G/UV 254 da marca Macherey-Nagel (20 x 20 cm) para realização de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).
- Sílica gel 60, 70-90 µm para utilização como fase estacionária na cromatografia líquida em coluna (CLC) da marca Agela Technologies.
- Sephadex LH-20 para realização de cromatografia por exclusão (CE).

3.1.3 – Equipamentos

- Liquidificador Arno®.
- Balança analítica Shimadzu modelo AUY 220.
- Evaporador rotativo marca Buchi R-3, acoplado à bomba de vácuo Vacuum pump V-700 Buchi, com controlador de pressão Vacuum Controller V-850 Buchi e banho ultra termostático SL-152.
- Evaporador rotativo marca Fisatom, acoplado à bomba de vácuo Vacuum pump V-700 e banho termostático Fisatom.
- Câmara UV Camag (254 nm e 366 nm).
- Equipamento de ressonância magnética nuclear Varian 400 MHz.
- Cromatógrafo gasoso CG-17A Shimadzu, modelo GC-EM QP 5000 acoplado à espectrômetro de massas (CG-EM).

3.2 – MÉTODOS

3.2.1 – Coleta da planta

Seis exemplares da espécie *Worsleya procera* foram coletados no dia 20 de Junho de 2014 (autorização de coleta SISBIO nº 41717 – Ministério do Meio Ambiente) na Área de Proteção Permanente (APP), dentro dos limites da Área de Proteção Ambiental da Região Serrana de Petrópolis (APA Petrópolis) no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Uma exsicata (nº 35307) foi depositada no Herbário VIES da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Luciana Dias Thomaz.

3.2.2 – Preparação do extrato bruto das raízes

As raízes foram trituradas em liquidificador juntamente com metanol e maceradas exaustivamente com metanol (48 horas). Ao final deste período, realizou-se a filtração e novamente adicionou-se metanol ao material retido no papel de filtro para nova maceração (48 horas). Este processo se repetiu da mesma forma por mais

uma vez. Ao final da maceração, o material retido foi descartado e os filtrados unificados e evaporados em evaporador rotativo obtendo-se o extrato bruto das raízes.

3.2.3 – Preparação dos extratos enriquecidos com alcaloides

Ao extrato bruto obtido, adicionou-se solução de ácido sulfúrico 2% (v/v) até pH 2 para garantir que os alcaloides presentes fossem protonados e, portanto, solúveis em solventes polares como água destilada. Em seguida, realizou-se a partição líquido-líquido com éter dietílico (Et₂O) (3 X 150 mL) para remoção de resinas lipofílicas e neutras dentre outros compostos. Posteriormente, a fase etérea obtida foi separada da fase aquosa ácida em funil de separação e descartada.

À fase aquosa acidificada foi adicionado acetato de etila (3 X 150 mL). A fase acetato de etila ácida foi submetida à concentração em evaporador rotativo até seca e armazenada para posterior confirmação da presença de alcaloides. Já a fase aquosa acidificada resultante foi alcalinizada com solução de hidróxido de amônio 25% (v/v) até pH 10 para desprotonação dos alcaloides presentes tornando-os solúveis em solventes orgânicos como hexano e acetato de etila.

Adicionou-se à fase aquosa alcalinizada resultante, 250 mL de hexano e realizou-se o particionamento por várias vezes (18 x 250 mL) até que nas fases hexânicas obtidas não fossem detectados alcaloides através da reação com reagente de Dragendorff (Figura 11).

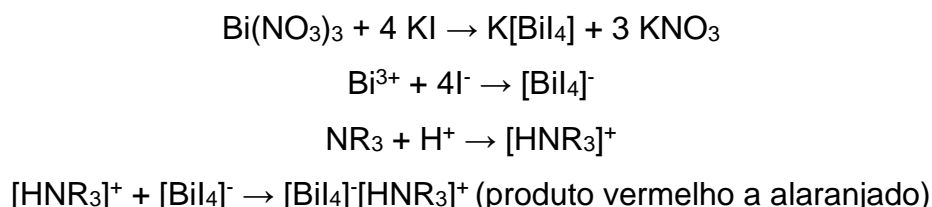


Figura 11: Reações envolvidas na detecção de alcaloides através do reagente de Dragendorff (CSEKE et al., 2006).

A utilização do reagente de Dragendorff baseia-se no fato do produto final ser um precipitado vermelho a alaranjado possível de ser visualizado nas placas de

cromatografia em camada delgada (CCD). Outros reagentes comumente empregados na identificação de alcaloides por CCD (Meyer, Bertrand, Sonnenchein) não foram considerados devido à formação de precipitados de coloração branca, o que compromete a detecção visual uma vez que as superfícies das placas são de coloração branca.

As fases hexânicas foram agrupadas e o solvente evaporado em evaporador rotativo até secura. A fase aquosa alcalinizada resultante foi submetida ao particionamento com acetato de etila utilizando-se 350 mL deste solvente (18 x 350 mL). O processo foi repetido até que nas fases em acetato de etila não fossem mais detectados alcaloides através da reação com reagente de Dragendorff. As fases em acetato de etila foram agrupadas e o solvente evaporado em evaporador rotativo até secura.

Por fim, adicionou-se 200 mL de solução acetato de etila:metanol 3:1 à fase aquosa alcalinizada e realizou-se o particionamento. Este procedimento foi realizado mais duas vezes. As fases em acetato de etila:metanol 3:1 foram agrupadas e o solvente evaporado em evaporador rotativo até secura.

Os extratos obtidos foram armazenados em dessecador sob vácuo por 48 horas, posteriormente foram pesados e identificados como WPR-H (extrato hexânico), WPR-AcA (extrato acetato de etila ácido), WPR-AcB (extrato acetato de etila básico), WPR-AcMOH (extrato acetato de etila:metanol). Posteriormente, foram armazenados em geladeira até o momento do fracionamento.

O fluxograma representado na Figura 12 resume as etapas de preparação dos extratos.

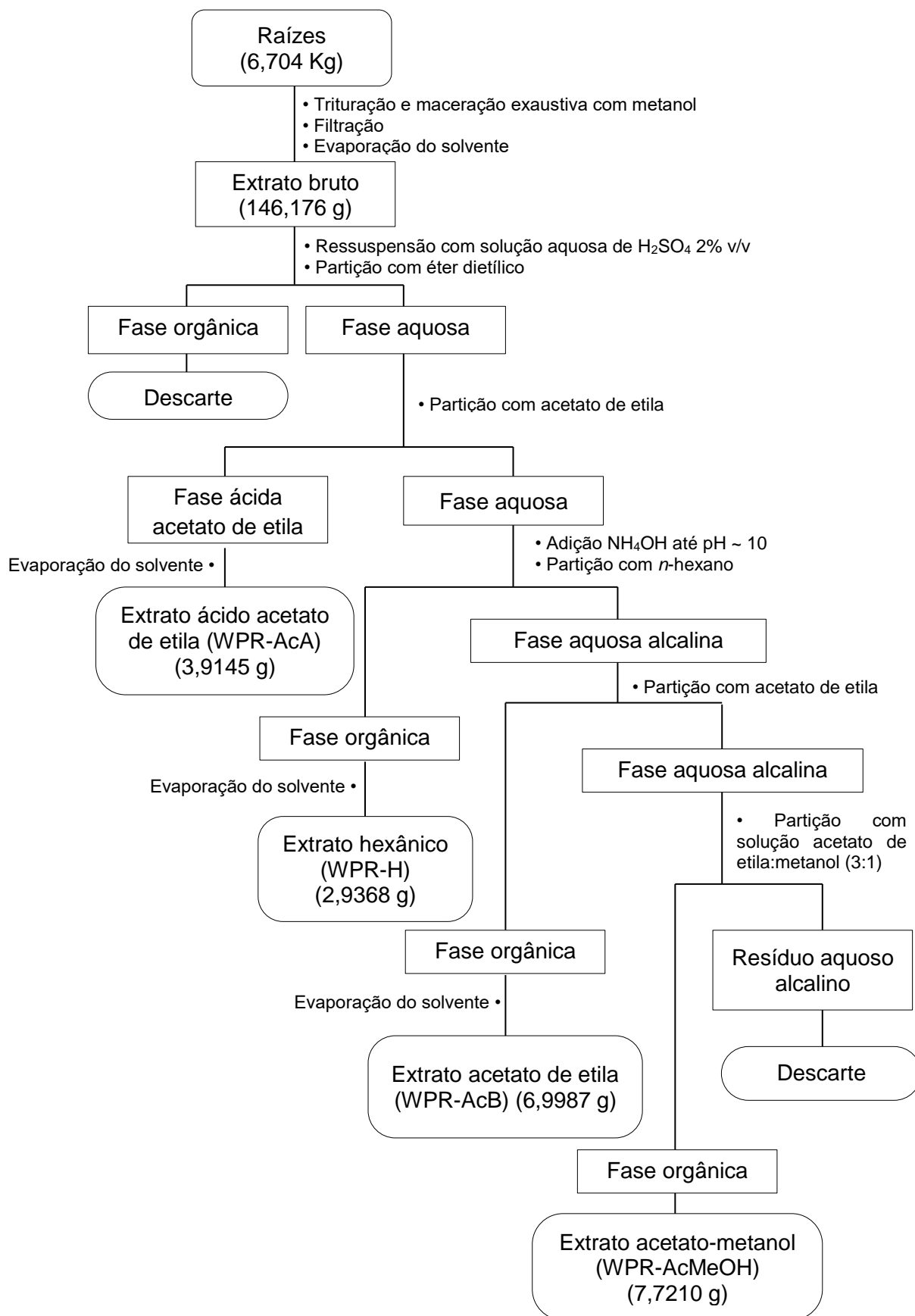


Figura 12: Processo de extração ácido-base para obtenção dos extratos enriquecidos com alcaloides.

3.2.4 – Análise exploratória de alcaloide

Foram realizados sucessivos testes para identificação de alcaloides por CCD nos quatro extratos obtidos (WPR-H, WPR-AcA, WPR-AcB e WPR-AcMeOH). Dois deles, WPR-H e WPR-AcB, apresentaram reação positiva para Dragendorff. Para os demais, WPR-AcMeOH e WPR-AcA, apenas traços de alcaloides foram verificados.

Desta forma, foi conduzida análise exploratória de alcaloides para os extratos WPR-H e WPR-AcB. Foram retidos 396,7 mg do extrato WPR-H e 310,5 mg do extrato WPR-AcB e uma alíquota de, aproximadamente, 5 mg destes extratos foi enviada para análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) para identificação dos alcaloides presentes.

3.2.4.1 – Metodologia:

As amostras foram solubilizadas em metanol grau HPLC e injetadas pelo método split 1:20 em cromatógrafo gasoso Shimadzu acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM), coluna cromatográfica apolar DB-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), temperatura do injetor a 280 °C, programação de temperatura 100 –180 °C a 15 °C min⁻¹, 1 min em 180°C, 180–300 °C a 5 °C min⁻¹ e 40 min a 300 °C. O fluxo utilizado foi de 0,8 mL.min⁻¹ e hélio como gás de arraste. A técnica de fragmentação molecular empregada foi impacto de elétrons a 70 eV.

Os dados obtidos foram comparados por similaridade com os disponíveis na biblioteca de alcaloides do professor Dr. Jaume Bastida da Universidade de Barcelona.

3.2.5 – Fracionamento cromatográfico, purificação e isolamento dos alcaloides

3.2.5.1 – Extrato WPR-H (extrato hexânico)

De 2936,8 mg do extrato WPR-H foram retidos 396,7 mg. O restante (2540,1 mg) foi solubilizado em metanol para realização do fracionamento cromatográfico. Durante a solubilização, observou-se a formação de precipitado branco levemente amarelado.

Este precipitado foi separado do sobrenadante, lavado, seco, pesado e enviado para análise de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) resultando no composto **1** (42,3 mg). A pureza do composto obtido foi verificada por cromatografia em camada delgada (CCD) empregando-se câmara de revelação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e, posteriormente, reagente de Dragendorff.

O sobrenadante (2497,8 mg) foi adsorvido em quantidade suficiente de sílica gel 60 (70-90 μm) para formação da cabeça da coluna cromatográfica. Foi realizado o fracionamento por cromatografia líquida a vácuo (CLV) conforme estabelecido por Coll e Bowden (1986), empregando-se 120g de sílica gel 60 (70-90 μm), coluna cromatográfica de separação com 3 cm de diâmetro e fase móvel com eluição em gradiente de concentração de solventes (Tabela 3).

TABELA 3 – FASES MÓVEIS ADOTADAS NO FRACIONAMENTO DE WPR-H

Hex (%)	AcOEt (%)	CHCl ₃ (%)	MeOH (%)	Volume (mL)	Hex (%)	AcOEt (%)	CHCl ₃ (%)	MeOH (%)	Volume (mL)
100	0	0	0	200	10	50	40	0	200
90	10	0	0	200	5	50	45	0	200
80	20	0	0	200	0	50	50	0	200
70	30	0	0	200	0	99	0	1	200
65	35	0	0	200	0	98	0	2	200
60	40	0	0	200	0	97	0	3	200
55	45	0	0	200	0	96	0	4	200
50	50	0	0	200	0	95	0	5	200
48	50	2	0	200	0	94	0	6	200
46	50	4	0	200	0	93	0	7	200
44	50	6	0	200	0	92	0	8	200
40	50	10	0	200	0	91	0	9	200
37	50	13	0	200	0	90	0	10	200
32	50	18	0	200	0	85	0	15	200
29	50	21	0	200	0	80	0	20	200
26	50	24	0	200	0	75	0	25	200
20	50	30	0	200	0	70	0	30	200
16	50	34	0	200	0	50	0	50	1800

Durante as análises preliminares por cromatografia em camada delgada (CCD) para definição das fases móveis a serem empregadas neste fracionamento observou-se que, ao acrescentar solvente clorado como clorofórmio ou diclorometano às fases contendo 50% de acetato de etila, havia melhora na resolução cromatográfica uma vez que as manchas obtidas apresentaram-se bem definidas e separadas.

O fracionamento resultou em 44 alíquotas que, posteriormente, foram reunidas por semelhança através da comparação de seus perfis cromatográficos obtidos por CCD obtendo-se quatro frações todas positivas para alcaloides (Figura 13). As frações foram concentradas em evaporador rotativo até secura, armazenadas a vácuo em dessecador por 48 horas e pesadas.

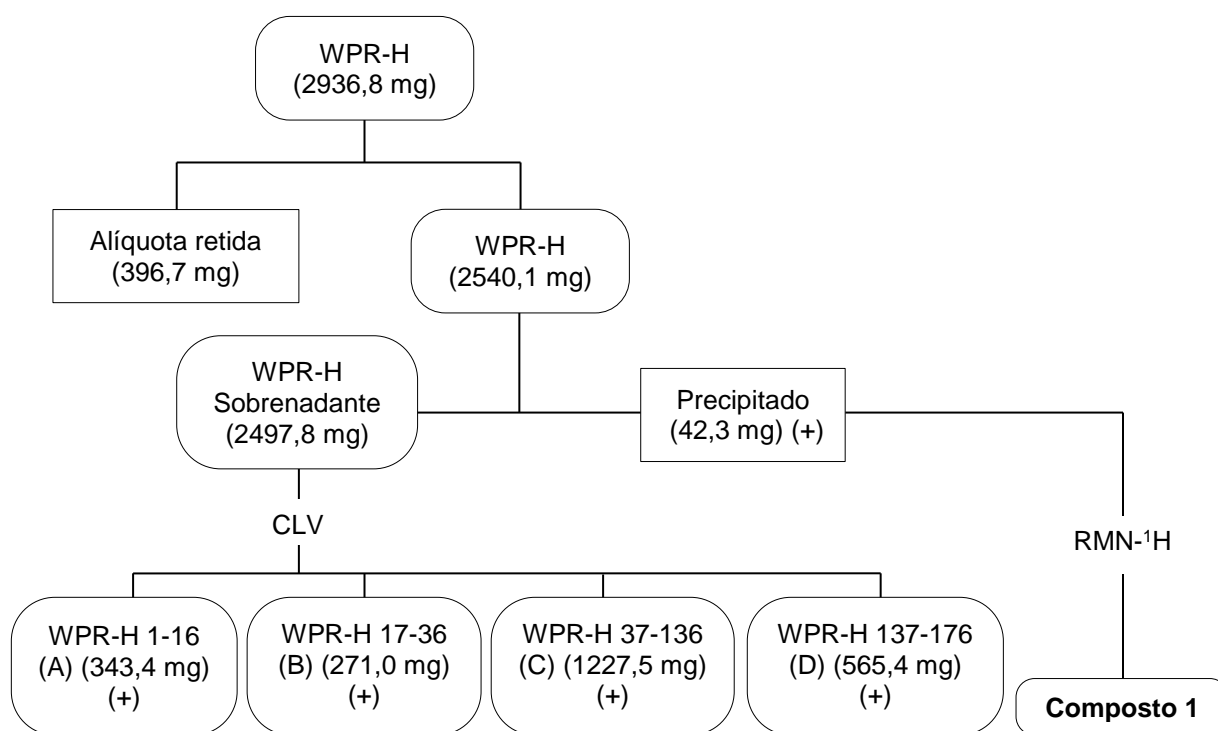


Figura 13: Fracionamento de WPR-H.

3.2.5.1.1 – Fracionamento de WPR-H 1-16 (A)

A fração WPR-H 1-16 (A) foi fracionada por cromatografia líquida em coluna (CLC) empregando-se 14,5g de sílica gel 60 (70-90 μ m) e coluna de separação de 1 cm de diâmetro. Esta fração foi solubilizada previamente em metanol e adsorvida em sílica

gel 60 (70-90 μm) em quantidade suficiente para formação da cabeça da coluna cromatográfica.

Análises preliminares por CCD para definição das fases móveis a serem empregadas no fracionamento demonstraram que, ao acrescentar solventes clorados em misturas contendo acetona, havia melhora na resolução cromatográfica (manchas bem definidas e separadas). Desta forma, as fases móveis empregadas neste fracionamento seguiram conforme Tabela 4.

TABELA 4 – FASES MÓVEIS ADOTADAS NO FRACIONAMENTO DE WPR-H 1-16 (A)

Fase móvel	Volume (mL)
Hexano:acetona (4:1)	400
Hexano:acetona (1:1)	350
Hexano:acetona:diclorometano (2:1:1)	300
Acetona:diclorometano (1:1)	250
Acetona:diclorometano:metanol (1:1:1)	200

Coletou-se 150 alíquotas que foram agrupadas por semelhança, de acordo com o perfil cromatográfico observado por cromatografia em camada delgada (CCD), obtiveram-se quatro subfrações, das quais apenas uma reagiu com Dragendorff (A_2). Esta subfração foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando-se sistema solvente composto por hexano, acetona e diclorometano nas proporções 1:1:2. Das nove subfrações obtidas, apenas uma reagiu com Dragendorff (A_{27}) (Figura 14). Após ser submetida à análise por RMN de ^1H , identificou-se o composto 2 (18,9 mg).

A pureza do composto 2 foi verificada por cromatografia em camada delgada (CCD) empregando-se câmara de revelação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e, posteriormente, reagente de Dragendorff.

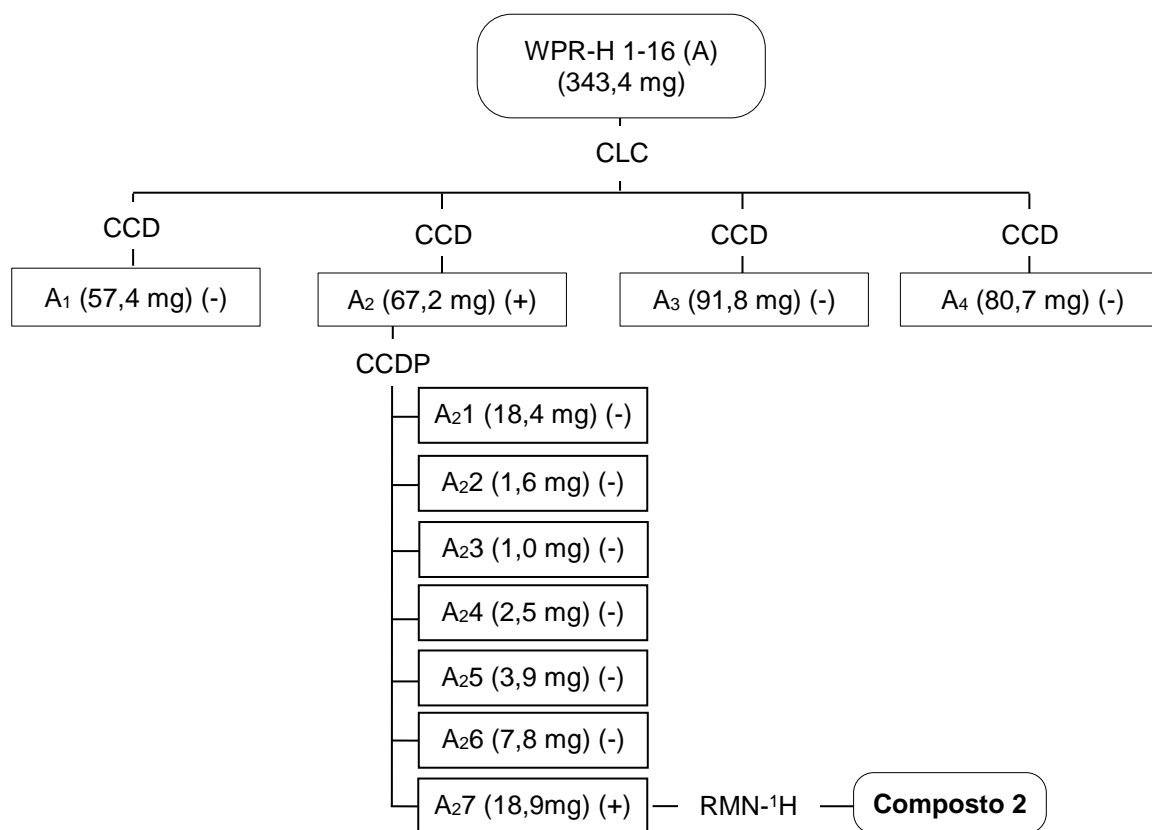


Figura 14: Obtenção das subfrações de WPR-H 1-16 (A).

3.2.5.1.2 – Fracionamento de WPR-H 17-36 (B)

Ao solubilizar 271,0 mg de WPR-H 17-36 (B) com metanol para preparo da cabeça da coluna cromatográfica, observou-se precipitação espontânea de 64,5 mg de um precipitado branco. Após separação do sobrenadante, o precipitado foi analisado por CCD e apresentou resultado negativo para Dragendorff. O sobrenadante (206,5 mg) foi submetido à separação por CLC empregando-se 12,2g de sílica gel 60 (70-90 μm) e coluna de separação de 1 cm de diâmetro.

Análises preliminares por CCD para definição das fases móveis a serem utilizadas neste fracionamento mostraram boa separação dos compostos quando as fases móveis listadas na Tabela 5 foram empregadas.

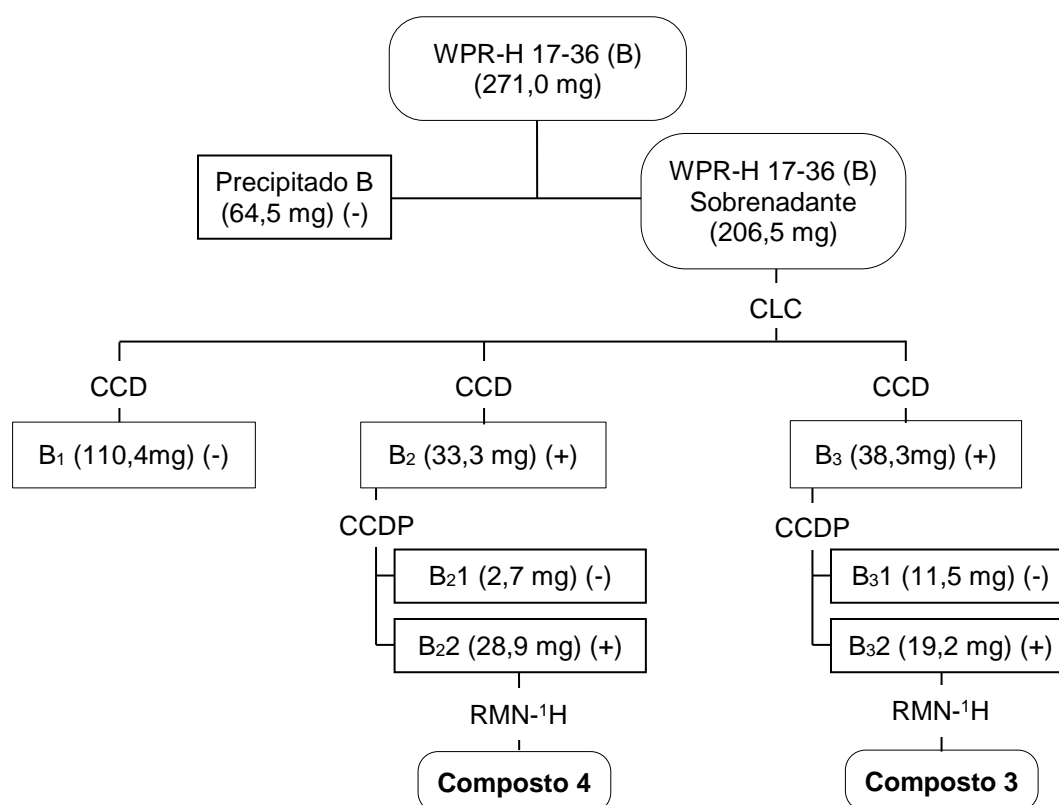
TABELA 5 – FASES MÓVEIS ADOTADAS NO FRACIONAMENTO DE WPR-H 17-36 (B)

Fase móvel	Volume (mL)
Hexano:acetona:diclorometano (2:1:1)	150
Hexano:acetona:diclorometano:metanol (3:3:1:2)	200
Acetona:metanol (1:1)	250

Coletou-se 83 alíquotas que foram agrupadas por semelhança, de acordo com o perfil cromatográfico observado por CCD, três subfrações foram obtidas e duas reagiram com Dragendorff (B₂ e B₃) (Figura 15).

As subfrações B₂ e B₃ foram submetidas à CCDP utilizando-se sistema solvente composto por hexano, acetona, diclorometano e metanol (3:3:1:2).

Foram obtidas quatro subfrações no total e duas delas foram positivas para Dragendorff (B₂₂ e B₃₂). Após serem submetidas à análise por RMN de ¹H, identificaram-se dois compostos: **3** e **4** (19,2 mg e 28,9 mg, respectivamente).

**Figura 15:** Obtenção das subfrações de WPR-H 17-36 (B).

A pureza dos compostos **3** e **4** foi verificada por cromatografia em camada delgada (CCD) empregando-se câmara de revelação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e, posteriormente, reagente de Dragendorff.

3.2.5.1.3 – Fracionamento de WPR-H 37-136 (C)

A fração WPR-H 37-136 (C) foi solubilizada em metanol e, após a preparação da cabeça da coluna, foi submetida à separação por CLC utilizando-se 72,4g de sílica gel 60 (70-90 μ m) e coluna de separação de 2 cm de diâmetro. As análises preliminares para definição das fases móveis a serem empregadas demonstraram melhor separação quando utilizadas as fases móveis descritas na Tabela 6.

TABELA 6 – FASES MÓVEIS ADOTADAS NO FRACIONAMENTO DE WPR-H 37-136 (C)

Fase móvel	Volume (mL)
Hexano:acetato de etila (2:1)	400
Hexano:acetato de etila:diclorometano (2:1:2)	450
Hexano:acetato de etila:diclorometano:metanol (2:1:2:1)	500
Acetona:diclorometano:metanol (2:2:1)	550
Acetona:metanol (1:1)	400
Metanol:água destilada (2:1)	200

As 493 alíquotas obtidas foram reagrupadas em nove subfrações, de acordo com o perfil cromatográfico apresentado (CCD). Destas, três reagiram com Dragendorff (+) (C₁, C₄ e C₇) (Figura 16).

As subfrações C₁ e C₄ foram submetidas à nova CLC. As fases móveis empregadas, quantidade de alíquotas e subfrações geradas encontram-se descritas na Tabela 7.

A subfração C₁₃, positiva para Dragendorff, foi submetida à CCDP empregando-se o sistema solvente composto por hexano, acetato de etila, diclorometano, acetona e metanol (1:2:2:1:1). Das cinco subfrações obtidas, duas reagiram com Dragendorff (C_{13.1} e C_{13.2}). Após serem submetidas à análise por RMN de ¹H, foi possível identificar dois compostos: **5** e **6** (10,7 mg e 2,7 mg, respectivamente) (Figura 16).

TABELA 7 – DADOS DO FRACIONAMENTO DAS SUBFRAÇÕES C₁ E C₄ DE WPR-H 37-136

Subfração	Dados da CLC	Fase móvel utilizada/volume
WPR-H 37-136 C ₁	Sílica gel 60 (70-90 µm): 16,5 g Diâmetro da coluna: 1cm Nº alíquotas: 80 Nº subfrações geradas: 3 Subfrações positivas para Dragendorff: 1 (C ₁₃)	Hexano:acetato de etila (2:1) / 100 mL Hexano:acetato de etila:metanol (2:4:1) / 200 mL Hexano:acetato de etila:diclorometano:metanol (1:2:1:1) / 200 mL
WPR-H 37-136 C ₄	Sílica gel 60 (70-90 µm): 23,4g Diâmetro da coluna: 1cm Nº alíquotas: 113 Nº subfrações geradas: 8 Subfrações positivas para Dragendorff: 1 (C ₄₃)	Hexano:acetato de etila (2:1)/100 mL Hexano:acetato de etila:acetona (4:2:1)/150 mL Hexano:acetona:diclorometano:metanol (2:1:2:1)/200 mL Acetona:diclorometano:metanol (2:1:1)/200 mL Acetona:metanol (1:1)/250 mL Metanol:água destilada (4:1)/100 mL

A subfração C₄₃, positiva para Dragendorff, foi submetida à CCDP. O sistema solvente empregado foi o mesmo adotado para a CCDP da subfração C₁₃. Das três subfrações obtidas, uma reagiu com Dragendorff (C_{43.2}). Após ser submetida à análise por RMN de ¹H, identificou-se o composto: **5** (8,1 mg) (Figura 16).

A subfração C₇ foi submetida à CCDP empregando-se sistema solvente composto por acetato de etila, acetona e metanol (2:1:1). Obtiveram-se oito subfrações das quais apenas uma reagiu com Dragendorff (C₇₄). Após ser submetida à análise por RMN de ¹H, identificou-se o composto **3** (14,6 mg) (Figura 16).

A pureza dos compostos **3**, **5** e **6** foi verificada por cromatografia em camada delgada (CCD) empregando-se câmara de revelação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e, posteriormente, reagente de Dragendorff.

3.2.5.1.4 – Fracionamento de WPR-H 137-176 (D)

A amostra foi solubilizada em metanol e adsorvida em sílica gel 60 (70-90 µm) para preparação da cabeça da coluna cromatográfica. Em seguida, foi submetida à separação por CLC utilizando-se 23,7g de sílica gel 60 (70-90 µm) e coluna de separação de 1 cm de diâmetro. As análises preliminares para definição das fases móveis a serem empregadas demonstraram melhor separação quando utilizadas as fases móveis descritas na Tabela 8.

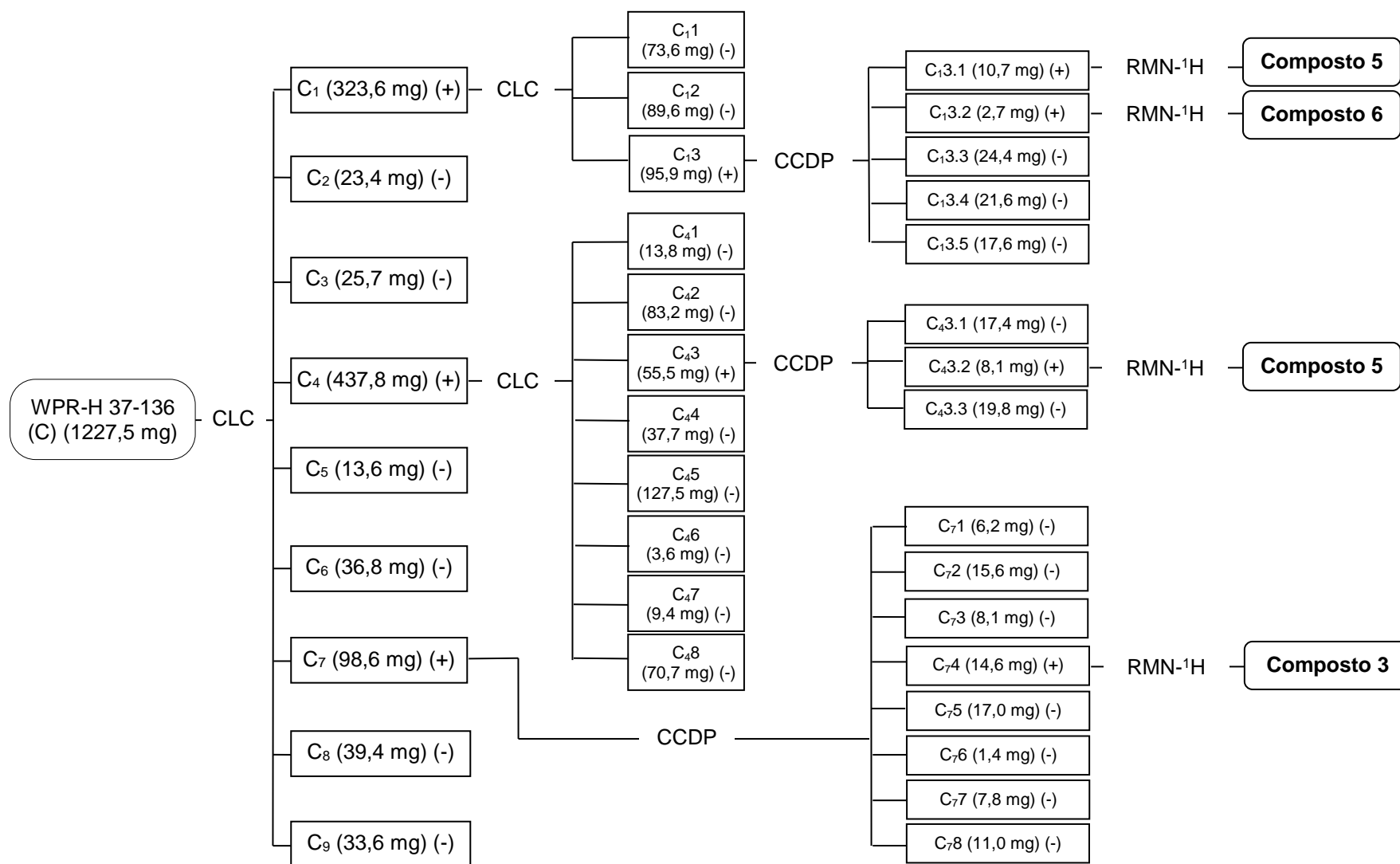


Figura 16: Obtenção das subfrações de WPR-H 37-136 (C).

TABELA 8 – FASES MÓVEIS ADOTADAS NO FRACIONAMENTO DE WPR-H 137-176 (D)

Hex (%)	AcOEt (%)	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 1:1 (%)	CH ₂ Cl ₂ (%)	MeOH (%)	NH ₄ OH a 35% (%)	H ₂ O (%)	Volume (mL)
100	0	0	0	0	0	0	200
50	50	0	0	0	0	0	200
0	100	0	0	0	0	0	200
0	90	10	0	0	0	0	200
0	80	20	0	0	0	0	200
0	70	30	0	0	0	0	200
0	60	40	0	0	0	0	200
0	50	50	0	0	0	0	200
0	40	60	0	0	0	0	200
0	30	70	0	0	0	0	200
0	20	80	0	0	0	0	200
0	10	90	0	0	0	0	200
0	0	100	0	0	0	0	200
0	0	0	40	60	0	0	200
0	0	0	30	70	0	0	200
0	0	0	20	80	0	0	200
0	0	0	10	90	0	0	200
0	0	0	0	90	10	0	200
0	0	0	0	80	5	15	200
0	0	0	0	70	10	20	200

As 285 alíquotas obtidas foram reagrupadas com base no perfil cromatográfico verificado por CCD. Oito subfrações foram obtidas, porém apenas uma reagiu com Dragendorff (D₁₅) (Figura 17).

A subfração D₅ foi submetida a uma nova CLC utilizando-se o mesmo sistema de eluição descrito na Tabela 8, 14,5g de sílica gel 60 (70-90 µm) e coluna de separação de 1 cm de diâmetro.

As 215 alíquotas coletadas foram reagrupadas em oito subfrações (Figura 17). Observou-se formação de cristal branco na subfração D₅₂, cristal levemente amarelado na subfração D₅₇ e cristal branco na subfração D₅₈ que após confirmação da presença de alcaloide (reação positiva com Dragendorff

empregando-se CCD) foram enviados para análise de RMN de ^1H resultando nos compostos **3**, **7** e **6** (46,5mg, 13,1mg e 12,8mg, respectivamente).

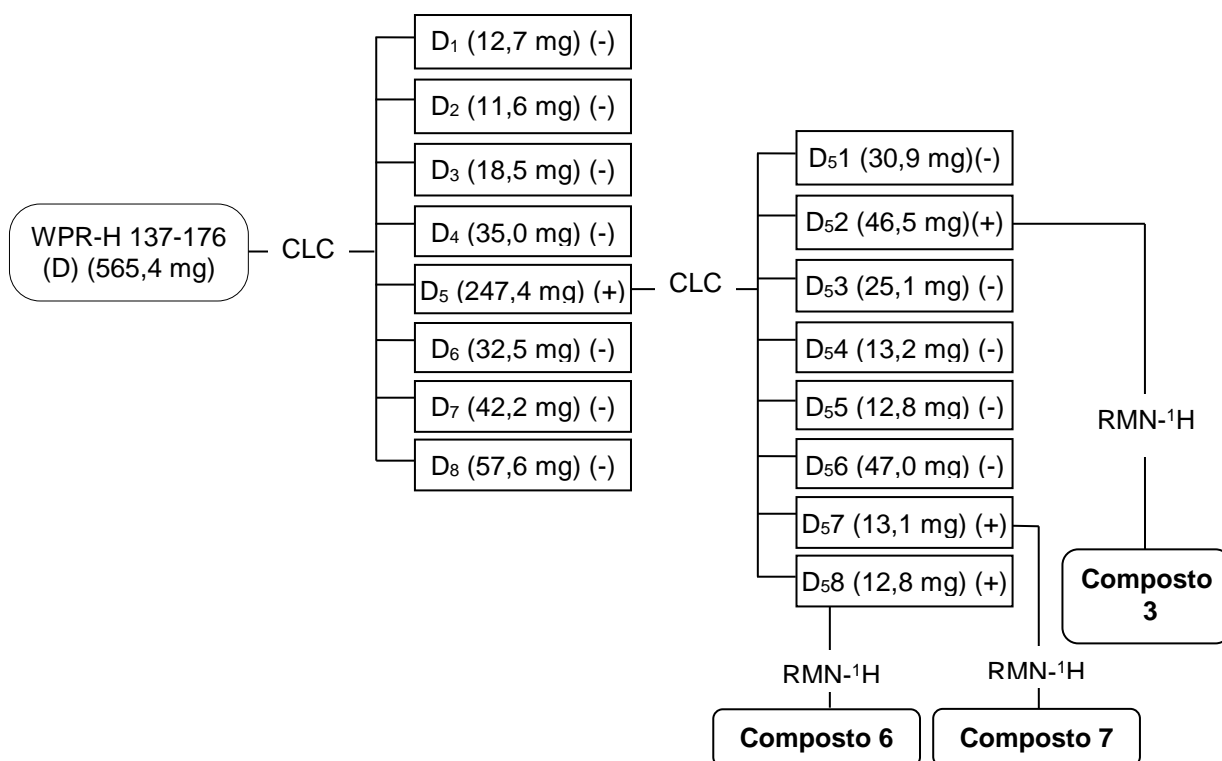


Figura 17: Obtenção das subfrações de WPR-H 137-176 (D).

A pureza dos compostos **3**, **6** e **7** foi verificada por cromatografia em camada delgada (CCD) empregando-se câmara de revelação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e, posteriormente, reagente de Dragendorff.

3.2.5.2 – Extrato WPR-AcB (extrato acetato de etila básico)

Durante a fase de concentração em evaporador rotativo do extrato WPR-AcB (6,9987 mg) observou-se a precipitação espontânea de um sólido branco levemente amarelado. Este precipitado foi separado do sobrenadante, lavado, seco, pesado. Após a confirmação da presença de alcaloide (reação positiva com Dragendorff), foi enviado para análise de RMN de ^1H resultando no composto **1** (504,9 mg).

O sobrenadante obtido foi concentrado, seco e pesado (6,4938 mg). Foram retidos 310,5 mg deste extrato e o restante (6183,3 mg) foi ressuspensionado em metanol para

fracionamento cromatográfico. Para isso, foi adsorvido em quantidade suficiente de sílica gel 60 (70-90 μm) para formação da cabeça da coluna cromatográfica. Em seguida, iniciou-se o fracionamento por cromatografia líquida a vácuo (CLV), empregando-se 250g de sílica gel 60 (70-90 μm), coluna cromatográfica de separação com 5 cm de diâmetro e fase móvel com eluição em gradiente de concentração de solventes (Tabela 9).

TABELA 9 – FASES MÓVEIS ADOTADAS NO FRACIONAMENTO DE WPR-AcB

Hex (%)	AcOEt (%)	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 1:1 (%)	Acetona (%)	MeOH (%)	Volume (mL)
100	0	0	0	0	400
50	50	0	0	0	400
0	100	0	0	0	400
0	90	10	0	0	400
0	80	20	0	0	400
0	70	30	0	0	400
0	60	40	0	0	400
0	50	50	0	0	400
0	40	60	0	0	400
0	30	70	0	0	400
0	20	80	0	0	400
0	10	90	0	0	400
0	0	100	0	0	400
0	0	0	40	60	400
0	0	0	30	70	400
0	0	0	20	80	400
0	0	0	10	90	400
0	0	0	0	100	400

O fracionamento resultou em 18 alíquotas que, posteriormente, foram reunidas por semelhança através da comparação de seus perfis cromatográficos obtidos por CCD obtendo-se seis frações (Figura 18), quatro delas positivas para alcaloides (E, G, H e I). As frações foram concentradas em evaporador rotativo até secura, armazenadas a vácuo em dessecador por 48 horas e pesadas.

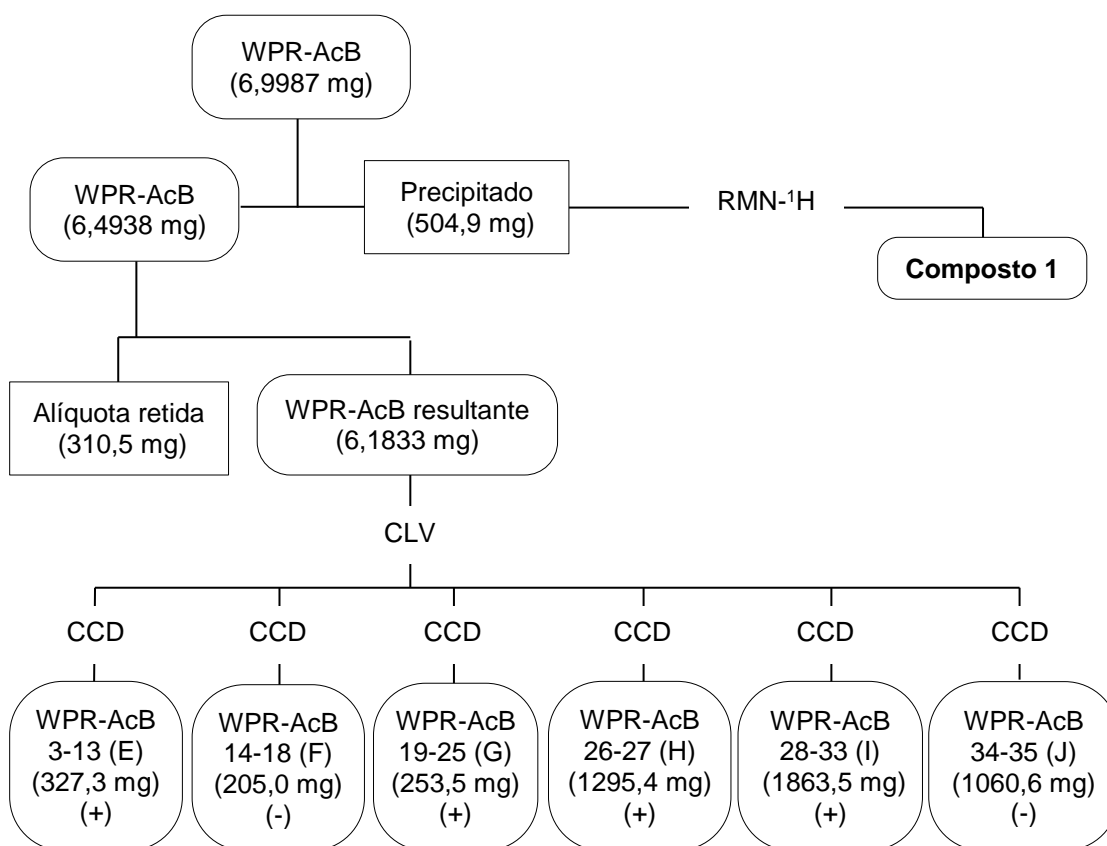


Figura 18: Fracionamento de WPR-AcB.

3.2.5.2.1 – Fracionamento de WPR-AcB 3-13(E)

A fração WPR-AcB 3-13(E) foi solubilizada em metanol e submetida à cromatografia por exclusão (CE) empregando-se sephadex®, coluna de 2 cm de diâmetro e metanol como eluente.

O fracionamento resultou em 75 alíquotas que, posteriormente, foram reunidas por semelhança através da comparação de seus perfis cromatográficos obtidos por CCD obtendo-se seis subfrações das quais apenas uma apresentou resultado positivo para alcaloide (E_6) (Figura 19).

Esta subfração foi submetida à CCDP empregando-se o sistema eluente composto por acetato de etila:diclorometano:acetona:metanol (1:1:1:1). Das cinco subfrações obtidas, apenas uma apresentou resultado positivo para alcaloide (E_{15}). Após análise por RMN de ^1H , constatou-se ser o composto **7** (5,7mg) (Figura 19).

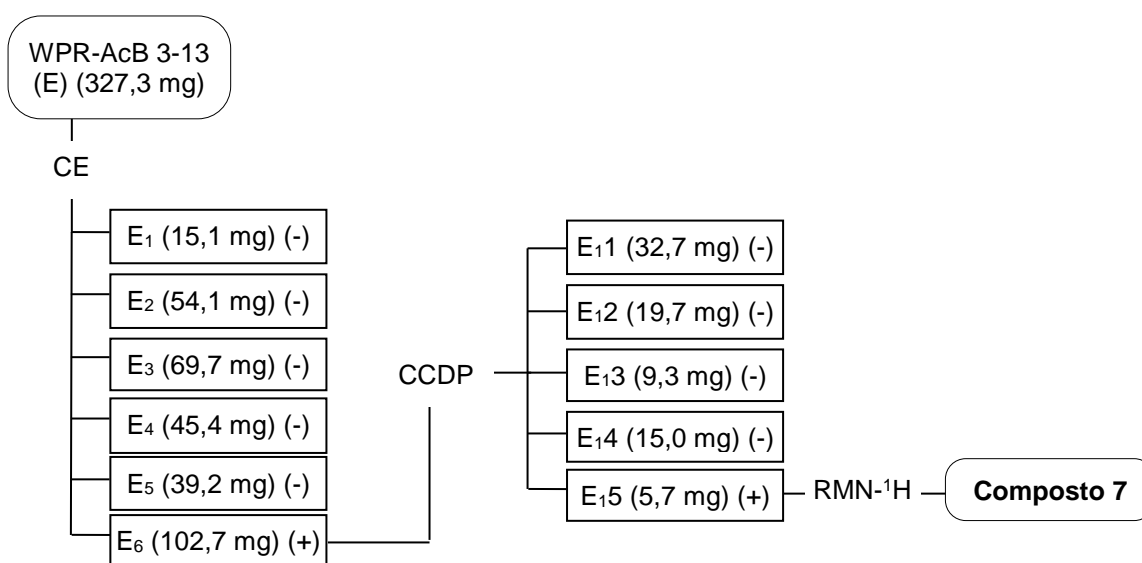


Figura 19: Fracionamento de WPR-AcB 3-13(E).

A pureza do composto **7** foi verificada por cromatografia em camada delgada (CCD) empregando-se câmara de revelação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e, posteriormente, reagente de Dragendorff.

3.2.5.2.2 – Fracionamento de WPR-AcB 19-25(G)

A fração WPR-AcB 19-25(G) foi solubilizada em metanol e submetida à cromatografia por exclusão (CE) empregando-se sephadex®, coluna de 2 cm de diâmetro e metanol como eluente.

O fracionamento resultou em 80 alíquotas que, posteriormente, foram reunidas por semelhança através da comparação de seus perfis cromatográficos obtidos por CCD obtendo-se seis subfrações das quais duas apresentaram resultado positivo para alcaloide (G₂ e G₆) (Figura 20).

Na subfração G₂ foi observada formação de cristal branco que após análise por RMN de ¹H constatou-se ser o composto **5** (8,0 mg) (Figura 20).

A subfração G₆ foi submetida à CCDP utilizando-se como o sistema eluente composto por acetato de etila:diclorometano:acetona:metanol (1:1:1:1).

Das seis subfrações obtidas, uma reagiu com reagente de Dragendorff (G₃₆). Após análise por RMN de ¹H, constatou-se ser o composto **2** (7,7 mg) (Figura 20).

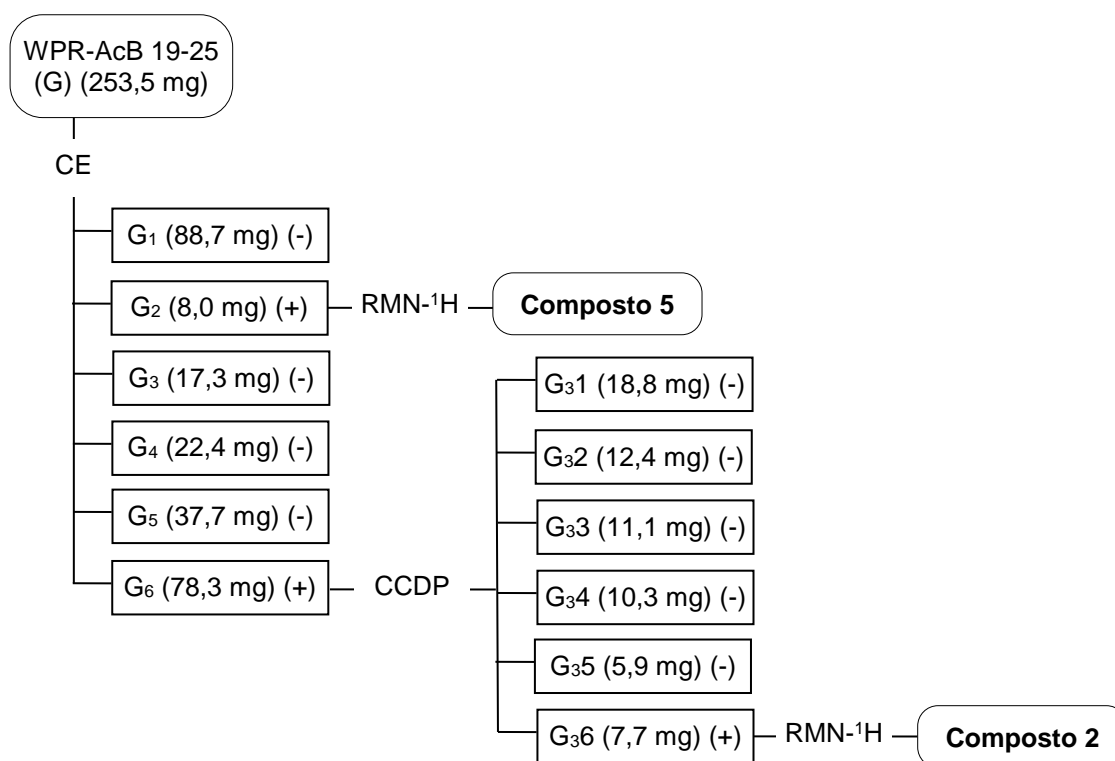


Figura 20: Fracionamento de WPR-AcB 19-25(G).

A pureza dos compostos **2** e **5** foi verificada por cromatografia em camada delgada (CCD) empregando-se câmara de revelação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e, posteriormente, reagente de Dragendorff.

3.2.5.2.3 – Fracionamento de WPR-AcB 26-27(H)

A fração WPR-AcB 26-27(H) foi solubilizada em metanol e submetida à cromatografia por exclusão (CE) empregando-se sephadex®, coluna de 2 cm de diâmetro e metanol como eluente.

O fracionamento resultou em 150 alíquotas que, posteriormente, foram reunidas por semelhança através da comparação de seus perfis cromatográficos obtidos por CCD obtendo-se quatro subfrações das quais apenas uma apresentou resultado positivo para alcaloide (H₂) (Figura 21).

Esta subfração foi submetida a uma CLC utilizando-se o sistema de eluição descrito na Tabela 10, 45,0g de sílica gel 60 (70-90 μ m) e coluna de separação de 2 cm de diâmetro.

TABELA 10 – FASES MÓVEIS ADOTADAS NO FRACIONAMENTO DE WPR-AcB 26-27(H)

Hex (%)	AcOEt (%)	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 1:1 (%)	Acetona (%)	MeOH (%)	Volume (mL)
100	0	0	0	0	100
50	50	0	0	0	100
0	100	0	0	0	100
0	90	10	0	0	100
0	80	20	0	0	100
0	70	30	0	0	100
0	60	40	0	0	100
0	50	50	0	0	100
0	40	60	0	0	100
0	30	70	0	0	100
0	20	80	0	0	100
0	10	90	0	0	100
0	0	100	0	0	100
0	0	0	40	60	100
0	0	0	30	70	100
0	0	0	20	80	100
0	0	0	10	90	100
0	0	0	0	100	100

As 360 alíquotas coletadas foram reagrupadas em sete subfrações das quais uma apresentou resultado positivo para alcaloide (H₂₅) (Figura 21).

A subfração positiva para alcaloides foi submetida à CCDP resultando em seis subfrações, das quais duas apresentaram resultado positivo para alcaloide (H₂₅ e H₂₆). Após análise de RMN de ¹H foram identificados os compostos **5** e **3** (2,1mg e 11,5mg, respectivamente) (Figura 21).

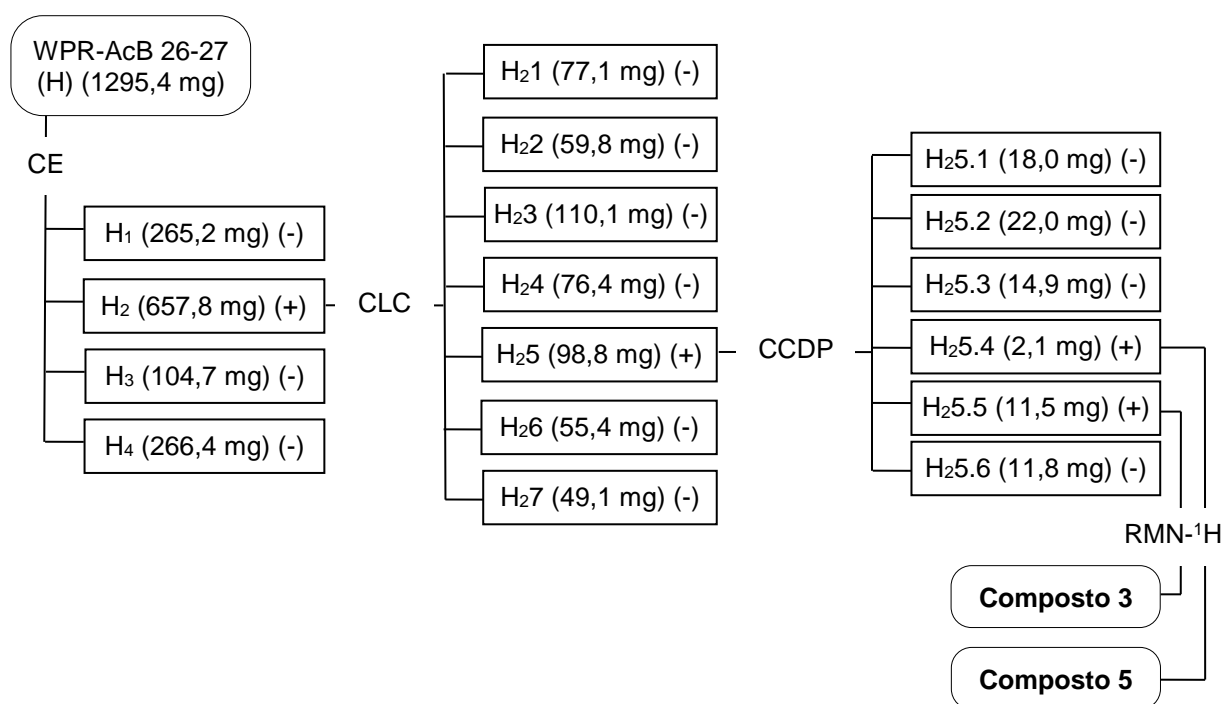


Figura 21: Fracionamento de WPR-AcB 26-27(H).

A pureza dos compostos **3** e **5** foi verificada por cromatografia em camada delgada (CCD) empregando-se câmara de revelação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e, posteriormente, reagente de Dragendorff.

3.2.5.2.4 – Fracionamento de WPR-AcB 28-33(I)

A fração WPR-AcB 28-33(I) foi solubilizada e submetida à cromatografia por exclusão (CE) empregando-se sephadex®, coluna de 2 cm de diâmetro e metanol como eluente.

O fracionamento resultou em 250 alíquotas que, posteriormente, foram reunidas por semelhança através da comparação de seus perfis cromatográficos obtidos por CCD obtendo-se oito subfrações das quais três apresentaram resultado positivo para alcaloide (I₃, I₅ e I₆).

As três subfrações positivas para alcaloides foram submetidas à CLC, separadamente. Os dados do fracionamento destas subfrações encontram-se descritos na tabela 11.

TABELA 11 – DADOS DO FRACIONAMENTO DAS SUBFRAÇÕES I₃, I₅ E I₆ DE WPR-AcB 28-33

Subfração	Dados da CLC	Fase móvel utilizada/volume
WPR-AcB 28-33 - I ₃	Sílica gel 60 (70-90 µm): 17,5 g Diâmetro da coluna: 1cm Nº alíquotas: 110 Nº subfrações geradas: 5 Subfrações positivas para Dragendorff: 1 (I ₃ 3)	Hexano:acetato de etila (2:1)/50 mL Acetato de etila:diclorometano:acetona (2:2:1)/200 mL Acetato de etila:diclorometano:acetona: metanol (2:2:1:1)/200 mL Acetona:metanol (1:1)/100 mL
WPR-AcB 28-33 - I ₅	Sílica gel 60 (70-90 µm): 16,4 g Diâmetro da coluna: 1cm Nº alíquotas: 110 Nº subfrações geradas: 4 Subfrações positivas para Dragendorff: 1 (I ₅ 3)	Hexano:acetato de etila (2:1)/50 mL Acetato de etila:diclorometano:acetona (2:2:1)/200 mL Acetato de etila:diclorometano:acetona: metanol (2:2:1:1)/200 mL Acetona:metanol (1:1)/100 mL
WPR-AcB 28-33 - I ₆	Sílica gel 60 (70-90 µm): 16,9 g Diâmetro da coluna: 1cm Nº alíquotas: 110 Nº subfrações geradas: 5 Subfrações positivas para Dragendorff: 1 (I ₆ 4)	Hexano:acetato de etila (2:1)/50 mL Acetato de etila:diclorometano:acetona (2:2:1)/200 mL Acetato de etila:diclorometano:acetona: metanol (2:2:1:1)/200 mL Acetona:metanol (1:1)/100 mL

As subfrações positivas para alcaloides foram submetidas à CCDP empregando-se como eluente o sistema composto por acetato de etila:diclorometano:acetona: metanol (1:1:1:1).

Da subfração I₃3 obteve-se seis subfrações das quais duas apresentaram-se positivas para alcaloide (I₃3.3 e I₃3.5). Após análise por RMN de ¹H foi possível identificar os compostos **5** e **3** (4,5mg e 22,5mg, respectivamente) (Figura 22).

Já a CCDP da subfração I₅3 gerou quatro subfrações das quais uma apresentou-se positiva para alcaloide (I₅3.4). Após análise por RMN de ¹H foi possível identificar o composto **2** (2,2mg) (Figura 22).

Foi observada na fração I₆4 a formação de um precipitado cristalino levemente amarelado. Este precipitado foi separado, lavado, seco e pesado. Posteriormente foi encaminhado para análise de RMN de ¹H identificando-se o composto **7** (5,0 mg).

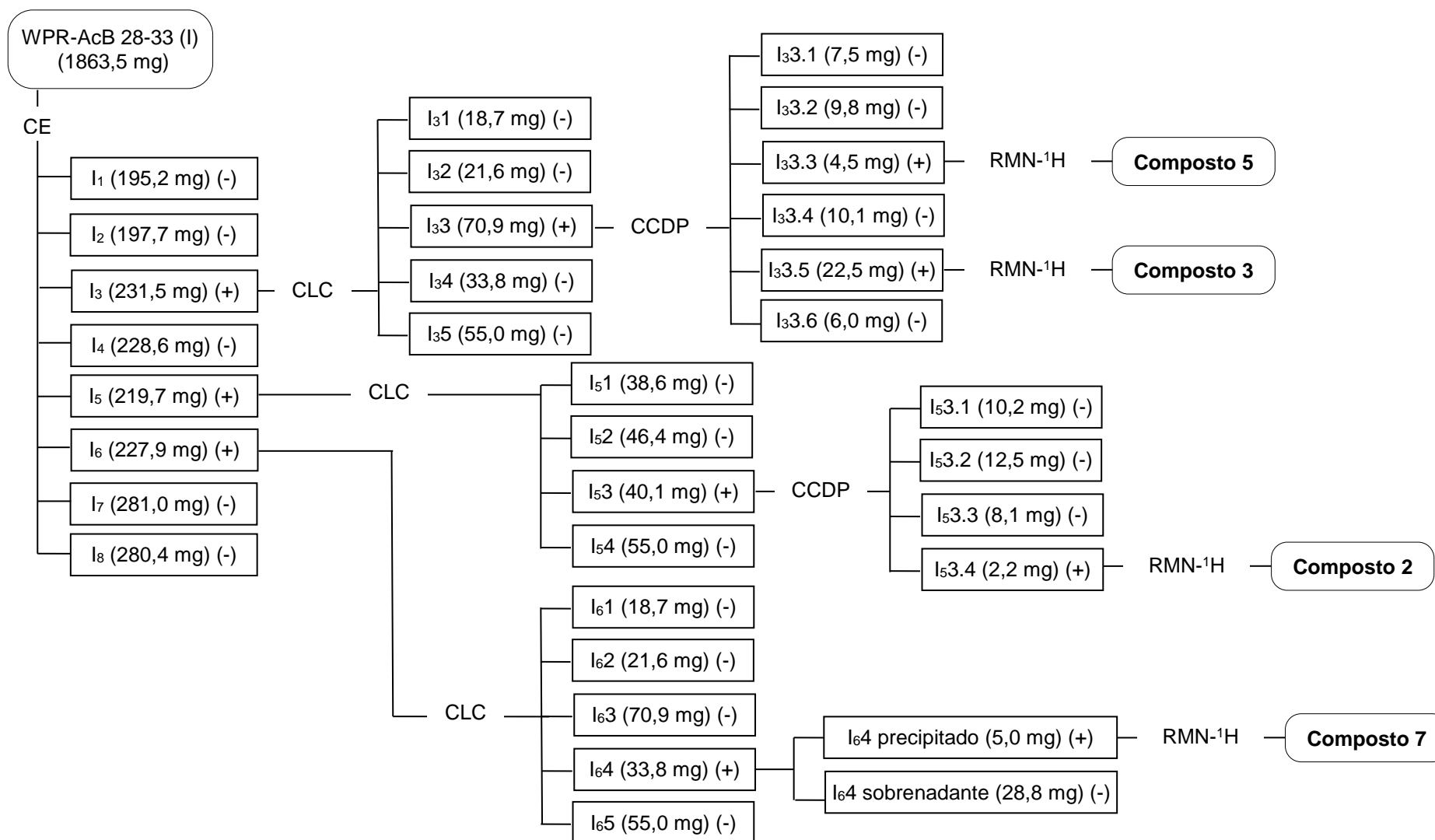


Figura 22: Fracionamento de WPR-AcB 28-33(I).

A pureza dos compostos **2**, **3**, **5** e **7** foi verificada por cromatografia em camada delgada (CCD) empregando-se câmara de revelação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e, posteriormente, reagente de Dragendorff.

3.2.5.3 – Extrato WPR-AcMOH

Após sucessivos testes para identificação de alcaloides por CCD, o extrato WPR-AcMOH não apresentou reação positiva para Dragendorff. Desta forma, este extrato não foi fracionado.

3.2.5.4 – Extrato WPR-AcA

Após sucessivos testes para identificação de alcaloides por CCD, o extrato WPR-AcA não apresentou reação positiva para Dragendorff. Desta forma, este extrato não foi fracionado.

3.2.6 – Identificação dos alcaloides por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H):

Os alcaloides isolados foram identificados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio comparando-se os espectros obtidos com os descritos na literatura.

As amostras foram pesadas e solubilizadas em metanol deuterado (CD₃OD) ou clorofórmio deuterado (CDCl₃) conforme as características de solubilidade de cada composto isolado. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de vidro para ressonância magnética nuclear e submetidas à análise em equipamento de ressonância magnética nuclear Varian 400 MHz com sonda 5 mm ATB BroaBand ¹H/¹⁹F/X.

De acordo com a massa da amostra pesada, foi estabelecido o número de *scans* a serem utilizados pelo equipamento. Para massas inferiores a 5 mg, foram empregados 256 *scans* e massas entre a 5 mg e 8 mg foram empregados 128 *scans*.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – ANÁLISE EXPLORATÓRIA (CG-EM)

A análise exploratória por CG-EM indicou a presença de 18 alcaloides não reconhecidos pela base de dados da biblioteca utilizada (Tabela 12). Destes, seis exibiram um padrão de fragmentação cujo pico base apresenta m/z 109, resultado do mecanismo de retro Diels-Alder no anel C sugestivo de alcaloides com esqueleto do tipo homolicorina (Figura 23) (BASTIDA et al., 2006).

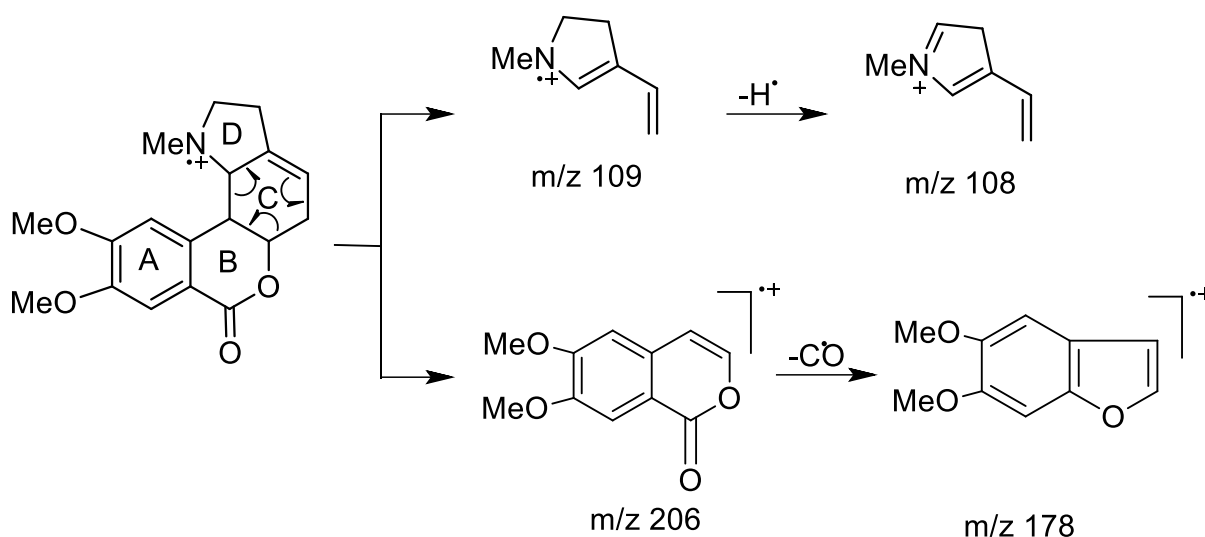


Figura 23: Formação dos fragmentos m/z 109 em alcaloides com esqueleto tipo homolicorina (Adaptado de BASTIDA et al., 2006).

Também se identificou padrões de fragmentação sugestivos de alcaloides com esqueleto do tipo haemantamina (Figura 24). No entanto, dependendo dos substituintes presentes em diversas posições e saturação do anel C outros padrões de fragmentação são obtidos (BASTIDA et al., 2006).

TABELA 12 - DADOS DE CG-EM DAS RAÍZES DE *Worsleya procera*

Alcaloide	TR (min)	% (TIC)		[M] ⁺	DADOS DA FRAGMENTAÇÃO OBTIDA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	REFERÊNCIAS
		WPR-H	WPR-AcB			
Ismina ^a	19.29	0,18	0,69	257(35)	238(100), 211(6), 196(8), 168(6), 154(3), 106(4), 77(3)	BERKOV et al., 2009
Trisfaeridina ^a	19.53	0,10	-	223(100)	222(38), 167(8), 165(9), 164(14), 138(20), 137(9), 111(13)	BERKOV et al., 2009
Galantindol ^a	22.86	0,09	2,75	281(100)	280(7), 264(13), 263(17), 262(20), 252(15), 191(14), 132(8)	UNVER et al., 2003
7-Metoxi-O-metillicorenina ^a	24.02	0,60	-	361(<1)	330(8), 221(10), 191(2), 110(8), 109(100), 108(15), 94(2)	DE ANDRADE et al., 2014
Tazetina ^a	25.05	33,77	31,31	331(31)	316(15), 298(23), 247(100), 230(12), 201(15), 181(11), 152(7)	BERKOV et al., 2004
Galantina ^a	26.50	1,48	9,52	317(22)	316(15), 298(10), 268(18), 243(96), 242(100), 228(8), 125(10)	BASTIDA et al., 1990
Licorina ^a	26.60	0,10	47,61	287(31)	286(19), 268(24), 250(15), 227(79), 226(100), 211(7), 147(15)	BERKOV et al., 2004
3-epimacronina ^a	27.01	14,63	-	329(78)	314(66), 255(71), 245(87), 225(68), 201(94), 139(78), 42(100)	VILADOMAT et al., 1990
Homolicorina ^a	26.54	5,54	0,34	315(<1)	178(4), 110(9), 109(100), 108(70), 94(16), 93(10), 82(11), 81(14)	BERKOV et al., 2008
Albomaculina ^a	27.23	21,19	-	345(<1)	221(1), 193(1), 165(1), 110(10), 109(100), 108(25), 94(2), 82(3)	SCHNOES et al., 1968
6-O-metillicorenina ^a	22.68	9,17	-	(-)	300 (77), 191(22), 110(9), 109(100), 108(55), 94(15), 93(7), 81(13)	BASTIDA et al., 2006
5,6 - Deidrobicolorina ^a	20.24	-	0,04	(-)	239(42), 238(100), 181(7), 180(27), 166(8), 152(13), 139(9)	VILADOMAT et al., 1990
Desconhecido A	28.15	1,92	1,23	(-)	345(17), 261(100), 239(14), 230(11), 228(26), 227(13), 197(14)	-
Desconhecido B	24.99	-	3,26	(-)	270(17), 241(18), 240(100), 238(71), 225(19), 210(50), 182(21)	-
Desconhecido C	23.76	-	0,34	(-)	300(7), 191(17), 110(9), 109(100), 108(58), 94(11), 91(4), 81(12)	-
Desconhecido D	25.98	-	0,46	(-)	257(100), 256(46), 247(68), 229(51), 227(62), 226(44), 225(71), 199(50)	-
Desconhecido E	26.04	-	0,34	(-)	110(9), 109(100), 108(67), 94(14), 93(9), 82(10), 81(15), 80(6)	-
Desconhecido F	27.89	-	0,64	(-)	389(6), 228 (5), 123 (6), 109(100), 108(58), 94(17), 93(13), 77(6)	-
Desconhecido G	27.17	-	1,37	(-)	110(7), 109(100), 108(61), 94(14), 93(7), 82(10), 81(9), 80(4), 79(4)	-
Desconhecido H	20.22	-	0,08	(-)	126(6), 125(73), 124(6), 97(8), 96(100), 94(15), 80(10), 77(7)	-
Desconhecido I	26.88	0,18	-	(-)	299(5), 191(17), 110(9), 109(100), 108(60), 94(14), 93(9), 81(12)	-
Desconhecido J	27.48	0,27	-	(-)	264(11), 263 (13), 191(16), 177(19), 109(100), 108 (50), 94(22), 93 (13)	-
Desconhecido K	25.38	0,21	-	(-)	297(100), 269(89), 268(82), 254(86), 237(35), 222(39), 194(30), 167(19)	-
Desconhecido L	16.16	0,11	-	(-)	345(10), 262(16), 261(100), 239(14), 230(10), 228(32), 225(13), 201(14)	-
Desconhecido M	23.22	0,11	-	(-)	359(16), 344(15), 276(16), 275(100), 239(20), 228(30), 169(73), 131(12)	-
Desconhecido N	24.01	1,00	-	(-)	258(47), 257(100), 256(55), 247(86), 229(59), 227(55), 225(95), 199(55)	-
Desconhecido O	25.11	0,23	-	(-)	313(85), 269(77), 270(34), 256(100), 241(95), 220(82), 212(22), 205(21)	-
Desconhecido P	26.09	1,04	-	(-)	343(19), 286(20), 285(100), 255(38), 253(35), 241(26), 225(33), 197(27)	-
Desconhecido Q	27.57	0,16	-	(-)	358(14), 357(79), 327(30), 298(26), 283(13), 282(100), 266(16), 238(15)	-
Desconhecido R	29.91	7,92	-	(-)	414(100), 396(60), 329(74), 255(43), 213(64), 145(52), 105(45), 91(48)	-

Legenda: ^acompostos identificados através dos dados de espectrometria de massas da biblioteca pertencente ao Dr. Jaume Bastida, Universidade de Barcelona.

^bTR: Tempo de retenção.

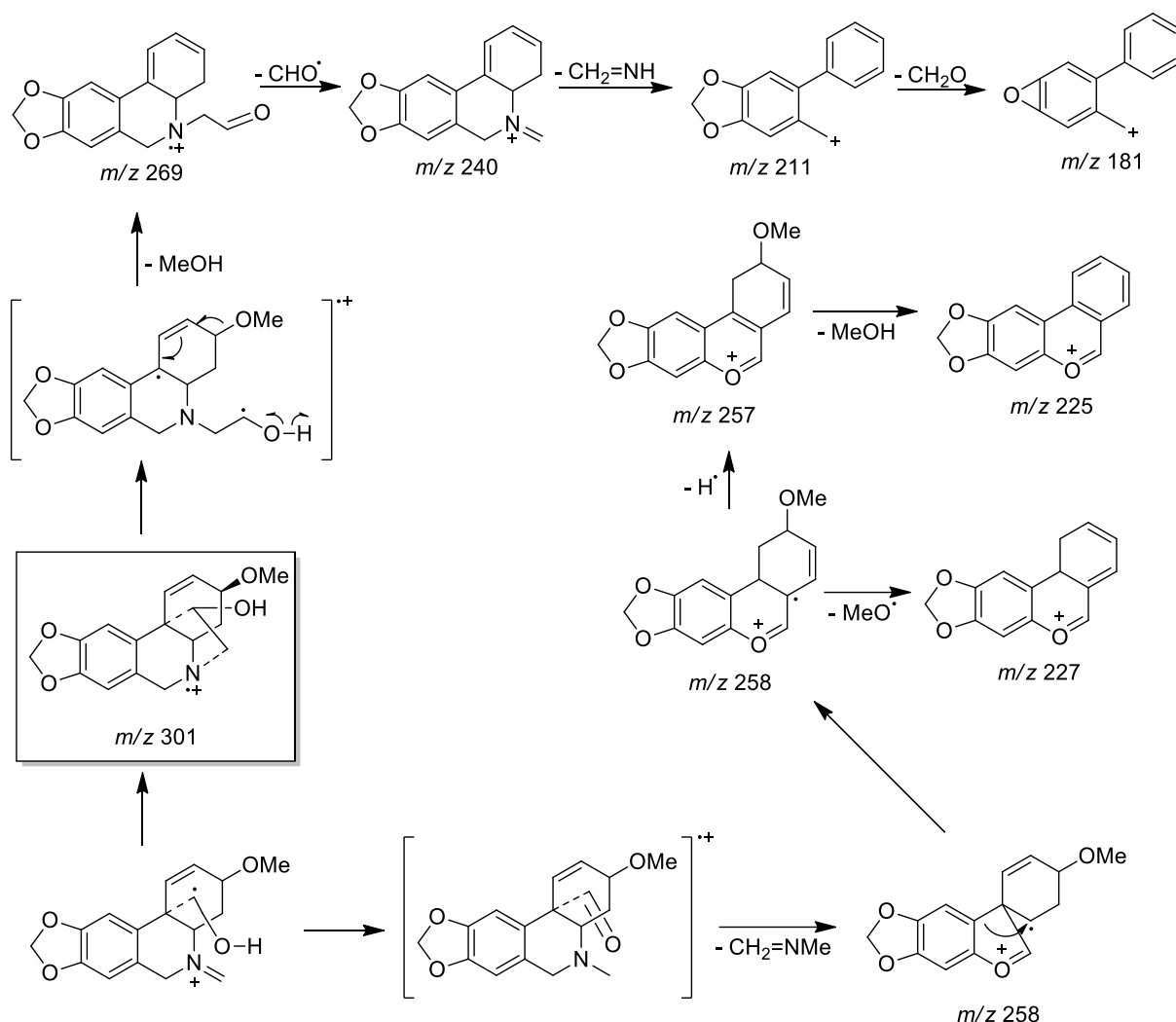


Figura 24: Principais fragmentos em alcaloides com esqueleto do tipo haemantamina (BASTIDA et al., 2006).

4.2 – TAXA DE RECUPERAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Para conhecer a eficiência dos processos cromatográficos utilizados determinou-se a taxa de recuperação cromatográfica (Tabela 13). Todas as análises apresentaram taxa de recuperação igual ou acima de 80%.

Para análises cromatográficas cujo princípio de separação é a adsorção, como CLV, CLC e CCDP, esta taxa é considerada aceitável uma vez que parte dos compostos aplicados pode permanecer adsorvida à fase estacionária (COLL; BOWDEN, 1986; KAUFMAN et al., 2006).

TABELA 13 – TAXA DE RECUPERAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Fração/subfração	Técnica cromatográfica	Massa aplicada (mg)	Massa total recuperada (mg)	Taxa de recuperação (%)
WPR-H	CLV	2497,8	2407,3	96,4
A	CLC	343,4	297,1	86,5
A ₂	CCDP	67,2	54,1	80,5
B	CLC	206,5	182,0	88,1
B ₂	CCDP	33,3	31,6	94,9
B ₃	CCDP	38,3	30,7	80,2
C	CLC	1227,5	1032,5	84,1
C ₁	CLC	323,6	259,1	80,1
C ₁₃	CCDP	95,9	77,0	80,3
C ₄₃	CCDP	55,5	45,3	81,6
C ₇	CCDP	98,6	81,7	82,9
D	CLC	564,4	457,5	81,0
D ₅	CLC	247,4	201,4	81,4
WPR-AcB	CLV	6183,3	5005,3	80,9
E	CE	327,3	326,2	99,7
E ₆	CCDP	102,7	82,4	80,2
G	CE	253,5	252,4	99,6
G ₆	CCDP	78,3	66,2	84,5
H	CE	1295,4	1294,1	99,9
H ₂	CLC	657,8	526,7	80,0
H ₂₅	CCDP	98,8	80,3	81,3
I	CE	1863,5	1862,0	99,9
I ₃	CLC	231,5	200,0	86,4
I ₃₃	CCDP	70,9	60,4	85,2
I ₅	CLC	219,7	180,1	82,0
I ₅₃	CCDP	40,1	33,0	82,3
I ₆	CLC	227,0	200,0	88,2

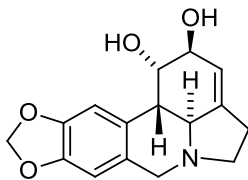
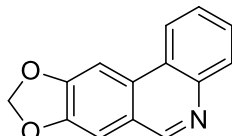
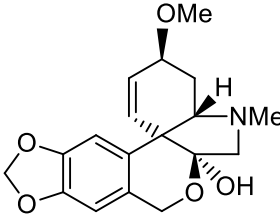
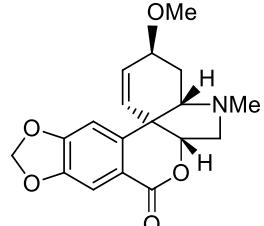
Observou-se que as análises cuja técnica empregada foi cromatografia por exclusão apresentaram maior taxa de recuperação. Isso se deve à não adsorção dos compostos pelas partículas de dextrano (componente da sephadex®). Com isso, toda a amostra aplicada na cabeça da coluna tende a ser recuperada ao final (COLLINS, 2011).

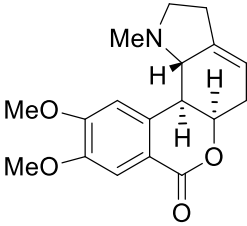
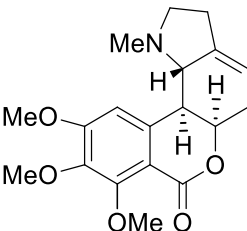
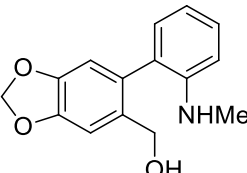
4.3 – RENDIMENTO E COMPOSTOS ISOLADOS

Foram isolados sete alcaloides, que após a comparação dos dados obtidos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio com os disponíveis na literatura, foram identificados como: licorina (**1**), trisfaeridina (**2**), tazetina (**3**), 3-epimcaronina (**4**), hamolicorina (**5**), albomaculina (**6**) e ismina (**7**) totalizando 791,9 mg de alcaloides. As frações e subfrações das quais estes alcaloides foram isolados, bem como a massa total obtida de cada um, encontra-se na Tabela 14. A massa total dos extratos ricos em alcaloides obtidos a partir de 6,704 Kg de raiz de *Worsleya procera* foi de 20,3166 g. O percentual total dos alcaloides isolados presentes nestes extratos totalizaram 3,9%.

TABELA 14 – DADOS DOS ALCALOIDES ISOLADOS

(continua)

Identificação	Alcaloide	Estrutura Química	Fração/ Subfração	Massa total (mg)	% alcaloide
Composto 1	Licorina		WPR-H WPR-AcB	547,2	2,69
Composto 2	Trisfaeridina		A ₂ 7 G ₃ 6 I ₅ 3.4	28,8	0,14
Composto 3	Tazetina		B ₃ 2 C ₇ 4 D ₅ 2 H ₂ 5.5 I ₃ 3.5	114,3	0,56
Composto 4	3- epimacronina		B ₂ 2	28,9	0,14

(conclusão)					
Identificação	Alcaloide	Estrutura Química	Fração/ Subfração	Massa total (mg)	% alcaloide
Composto 5	Homolicorina		C ₁ 3.1 C ₄ 3.2 G ₂ H ₂ 5.4 I ₃ 3.3	33,4	0,16
Composto 6	Almobaculina		C ₁ 3.2 D ₅ 8	15,5	0,08
Composto 7	Ismina		D ₅ 7 E ₁ 5 I ₆ 4	23,8	0,12

Os dados que possibilitaram a identificação dos alcaloides isolados são mostrados a seguir.

4.3.1 – Composto 1

O espectro de RMN de ^1H do composto 1 (Figura 25) apresentou um sinal em δ 5,93 ppm característico do grupo metilenodioxifenila ($\text{OCH}_2\text{O-Phe}$) em alcaloides. Não foram detectados sinais relacionados aos grupos metoxilas (OMe) e N-metila (NMe).

Os sinais observados em δ 6,66 e δ 6,91 ppm são característicos dos hidrogênios aromáticos na posição *para* e correspondem às posições 7 e 10 do anel A. Um multiplete em δ 5,57 ppm indica a presença de um único hidrogênio olefínico na molécula.

Dois sinais em δ 3,56 e δ 4,14 ppm com constante de acoplamento ($^2J_{\text{H}6\alpha, \text{H}6\beta}$) de aproximadamente 14 Hz indicam hidrogênios geminais do sistema AB representados

pelos hidrogênios α e β da posição 6 (EVIDENTE et al., 1983; BASTIDA et al., 2006).

Um dubleto em δ 2,45 ppm com $^2J_{gem}$ igual a 17,6 Hz, indica a presença de mais dois hidrogênios geminais na molécula, possivelmente os hidrogênios da posição 12.

No entanto, observou-se que devido ao uso de metanol deuterado (CD_3OD), houve sobreposição de um dos sinais referente ao solvente (δ 3,32 a δ 3,35 ppm) com o sinal relacionado a um dos hidrogênios geminais. Por esta razão, não se determinou adequadamente a multiplicidade do sinal, tampouco a constante de acoplamento de um dos dois hidrogênios. De acordo com a literatura, este problema pode ser solucionado utilizando dimetilsulfóxido deuterado ($DMSO-D_6$) como solvente ao invés de CD_3OD (BASTIDA et al., 2006).

Observou-se que os hidrogênios β das posições 6 e 12 encontram-se mais desblindados do que aqueles da posição α . De acordo com as pesquisas realizadas por Bastida e colaboradores (2006), este fato ocorre devido à relação entre os hidrogênios β e o par de elétrons livres do nitrogênio, pois se encontram na posição *cis*.

Dois dubletos largos em δ 2,89 e δ 2,73 ppm com $^3J_{4a,10b}$ igual a 10,8Hz demonstram que a junção dos anéis B e C possui uma relação *trans*-diaxial entre os hidrogênios da posição 4a e 10b (BASTIDA et al., 2006).

Como não foram identificados sinais para metoxilas, comumente encontradas em alcaloides derivados de homolicorina, haemantamina, tazetina, galantamina e montamina, hidroxilas podem estar presentes, uma vez que este grupo é habitualmente encontrado no alcaloide com esqueleto do tipo licorina (BASTIDA et al., 2006; BASTIDA et al., 2011). Os sinais em δ 4,49 e δ 4,19 ppm foram atribuídos a hidrogênios próximos às hidroxilas.

Com base nos dados obtidos na análise preliminar, na análise por RMN de 1H e de acordo com a literatura (Tabela 15), o composto possui familiaridade com o alcaloide

licorina (Figura 26). As diferenças no deslocamento químico podem estar relacionadas aos diferentes solventes deuterados empregados nesta análise e na análise realizada por LIKHITWITAYAWUID e colaboradores (1993).

TABELA 15 - DADOS DE RMN de ^1H (CD_3OD , 400 MHz) DO COMPOSTO 1 COMPARADOS COM A LITERATURA (LIKHITWITAYAWUID, et al., 1993) ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz).

Posição	δ_{H} (ppm) (J em Hz) Composto 1	δ_{H} (ppm) (J em Hz) literatura
H-1	4,49 <i>l s</i>	4,27 <i>l s</i>
H-2	4,19 <i>m</i>	3,97 <i>l s</i>
H-3	5,57 <i>m</i>	5,37 <i>l s</i>
H-4a	2,89 <i>l d</i> (10,8)	2,60 <i>d</i> (10,6)
H-6 α	3,56 <i>dd</i> (13,9; 1,5)	3,32 <i>d</i> (14,4)
H-6 β	4,14 <i>d</i> (14,2)	4,02 <i>d</i> (14,4)
H-7	6,66 <i>s</i>	6,68 <i>s</i>
H-10	6,91 <i>s</i>	6,81 <i>s</i>
H-10b	2,73 <i>l d</i> (10,8)	2,50 <i>m</i>
H-11 α	2,56 – 2,63 <i>m</i>	2,44 <i>m</i>
H-11 β	2,56 – 2,63 <i>m</i>	2,44 <i>m</i>
H-12 α	2,45 <i>dd</i> (17,6; 9,2)	2,19 <i>ddd</i> (14,4; 8,6; 1,5)
H-12 β	3,32 – 3,35 <i>m</i>	3,19 <i>dd</i> (14,4; 7,5)
OCH ₂ O	5,93 <i>d</i> (1,2) e 5,94 <i>d</i> (1,2)	5,94 <i>s</i> e 5,96 <i>s</i>

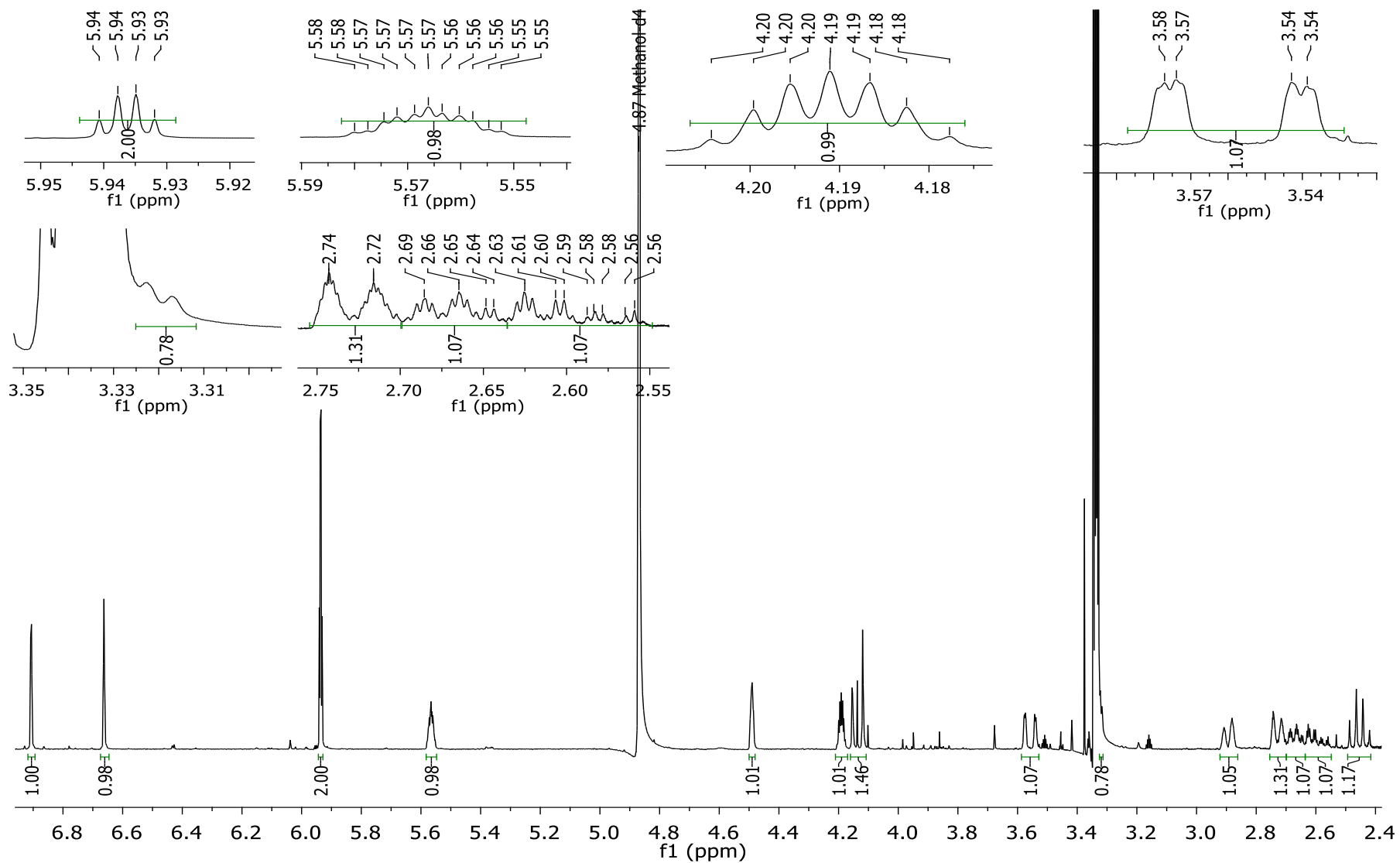


Figura 25: Espectro de RMN de ^1H do composto **1** com expansões (CD_3OD , 400 MHz).

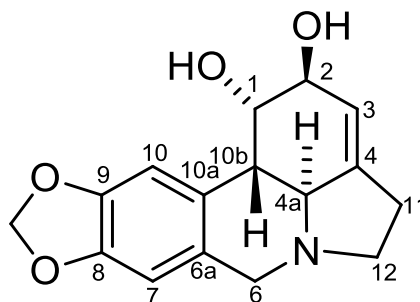


Figura 26: Estrutura química do alcaloide licorina (1).

Alcaloide majoritário dentre as espécies de Amaryllidaceae, licorina é insolúvel na maioria dos solventes orgânicos (EVIDENTE et al., 1983; BASTIDA et al., 2006). Este composto é estável em temperatura ambiente por, aproximadamente, três anos (REFAAT et al., 2012). Estudos relacionados à atividade biológica deste alcaloide demonstraram múltiplos efeitos farmacológicos (REFAAT et al., 2012).

Luo e colaboradores (2012) observaram uma atividade citotóxica *in vitro* maior para licorina do que para o controle positivo (cisplatina) frente às células de leucemia mieloide humana HL-60 e K562, células de carcinoma pulmonar A549, células de hepatocarcinoma HepG2 e células do câncer de cólon HT-29. Licorina quando testada frente a linhagens celulares do epitélio brônquico não tumorais, Beas-2B, apresentou IC₅₀ maior do que o índice apresentado para células tumorais.

Em pesquisa anterior, McNulty e colaboradores (2007) verificaram que a ação da licorina sobre as células de leucemia mieloide ocorre através da suspensão do ciclo celular (mitose) e indução da apoptose. A ação de indução da apoptose atribuída à licorina está relacionada ao grupo farmacofórico composto pelo anel C e aos dois grupos hidroxilas presentes (MCNULTY et al., 2009).

Refaat e colaboradores (2012) verificaram um grande número de estudos envolvendo a avaliação da ação citotóxica da licorina frente a diferentes tipos de cânceres e concluíram que este alcaloide é um candidato em potencial no tratamento de tumores malignos como os encontrados no pâncreas e fígado.

Atividade antimalária *in vitro* foram observadas e descritas por Campbell e colaboradores (1998), Likhitwitayawuid (1993), Şener e colaboradores (2003) e Cedrón e colaboradores (2010). Os grupos hidroxilas localizados nos carbonos 1 e 2 e a dupla ligação entre os carbonos 3 e 4 parecem ser os responsáveis pela atividade antiplasmódica (CEDRÓN et al., 2010).

Bessa (2015) verificou atividade antiparasitária contra as formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania infantum* e contra a forma amastigota de *Trypanossoma cruzi*. Licorina também é empregada como precursor na semissíntese de alcaloides contra *Trichomonas vaginalis* (GIORDANI et al., 2012).

He e colaboradores (2012) observaram atividade antiviral contra influenza H5N1. De acordo com os pesquisadores, licorina atua no bloqueio da replicação do RNA viral suprimindo a síntese proteica.

O alcaloide assoanina (figura 27), derivado da licorina, mostrou-se o mais ativo inibidor da enzima acetilcolinesterase dentre os alcaloides com esqueleto do tipo licorina. Os estudos mostraram que este composto é quatro vezes mais potente do que o apresentado pelo alcaloide galantamina, empregado no tratamento da doença de Alzheimer (NAIR; VAN STADEN, 2012; REFAAT et al., 2012).

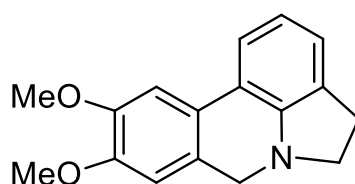


Figura 27: Estrutura química do alcaloide assoanina.

Nair e Van Staden (2014) e Chinsembu (2016) mencionam o uso de espécies de Amaryllidaceae ricas em licorina por tribos africanas no tratamento da tuberculose, porém não apresentam dados científicos que atribuam a este alcaloide tal atividade.

4.3.2 – Composto 2

O espectro de RMN de ^1H do composto **2** (Figura 28) apresentou-se com sinais na parte mais desblindada. Um singleto em δ 6,18 ppm ($J=2\text{H}$) foi atribuído ao grupo metilenodioxifenila ($\text{OCH}_2\text{O-Phe}$), largamente presente nos alcaloides de Amaryllidaceae. Foram observados dois singletos e vários desdobramentos de sinais na região do espectro correspondente aos hidrogênios aromáticos. Os singletos indicam presença de hidrogênios *para* orientados e apresentam deslocamentos químicos em 7,35 ppm e 7,93 ppm. Desta forma, atribuiu-se a estes hidrogênios as posições 7 e 10 do anel A, respectivamente.

De acordo com os desdobramentos dos sinais e as constantes de acoplamento, foi possível identificar hidrogênios que acoplam entre si na posição *orto* (3J entre 7 e 8 Hz, aproximadamente) e *meta* (3J entre 1 e 2 Hz, aproximadamente). Logo, concluiu-se que a molécula possui outro anel aromático (anel C) que contribui com os hidrogênios das posições 1, 2, 3 e 4 da molécula em análise.

Não foram observados sinais sugestivos de grupos N-metila e metoxilas. Apenas um singleto ($J=1\text{H}$) observado na região mais desblindada do espectro em δ 9,09 ppm. Atribuiu-se a este sinal o hidrogênio da posição 6, próximo ao átomo de nitrogênio do anel B. Logo, foi possível concluir que o anel B possui uma instauração entre o carbono da posição 6 e o átomo de nitrogênio vizinho.

Esses resultados foram comparados com aqueles constantes na literatura (Tabela 16) o que possibilitou a identificação do composto **2** como trisfaeridina (Figura 29).

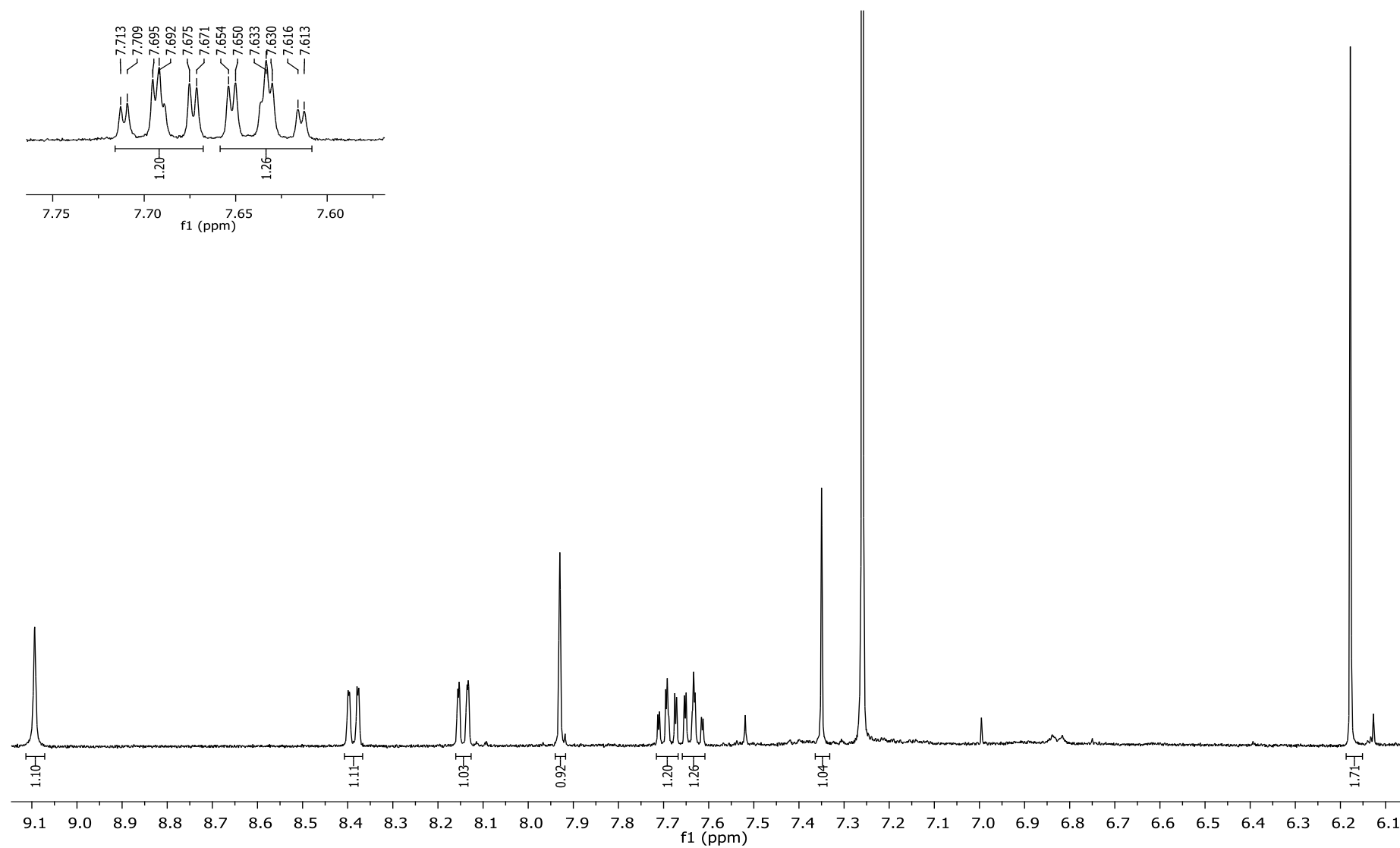


Figura 28: Espectro de RMN de ^1H do composto **2** com expansões (CDCl_3 , 400 MHz).

TABELA 16 - DADOS DE RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) DO COMPOSTO **2** COMPARADOS COM A LITERATURA (CDCl_3 , 200 MHz) (SUAU et al., 1990).

Posição	δ_{H} (ppm) (<i>J</i> em Hz) Composto 2	δ_{H} (ppm) (<i>J</i> em Hz) literatura
H-1	8,39 <i>dd</i> (8,1; 1,5)	8,36 <i>dddd</i> (8,0; 1,8; 1,0; 1,0)
H-2	7,63 <i>ddd</i> (8,3; 7,0; 1,5)	7,61 <i>ddd</i> (8,0; 7,0; 1,7)
H-3	7,69 <i>ddd</i> (8,0; 7,0; 1,6)	7,67 <i>ddd</i> (7,0; 7,0; 1,8)
H-4	8,15 <i>dd</i> (8,1; 1,1)	8,11 <i>ddd</i> (7,0; 1,7; 1,0)
H-6	9,09 <i>s</i>	9,06 <i>s</i>
H-7	7,35 <i>s</i>	7,32 <i>s</i>
H-10	7,93 <i>s</i>	7,89 <i>s</i>
OCH_2O	6,18 <i>s</i>	6,15 <i>s</i>

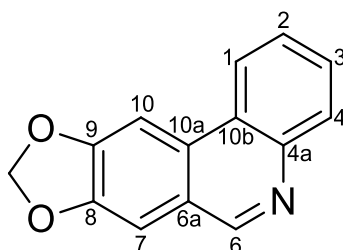


Figura 29: Estrutura química do alcaloide trisfaeridina (**2**).

Bastida e colaboradores (2006) classificaram a trisfaeridina como alcaloide derivado do esqueleto do tipo narciclasina.

Ao contrário do alcaloide licorina, poucos estudos envolvendo atividades biológicas foram encontrados na literatura para a trisfaeridina. Brine e colaboradores (2002) realizaram estudo relacionado à atividade citotóxica para este alcaloide, porém não houve comprovação de atividade. Szilávik e colaboradores (2004) observaram que trisfaeridina, homolicorina e haemantamina inibiram a replicação do vírus HIV-1 *in vitro*. A atividade antiviral da trisfaeridina também foi constatada por Oluyemisi e colaboradores (2015) que após conduzirem estudo para avaliação da atividade anti-poliovírus através do método MTT concluíram que este alcaloide possui atividade moderada contra o vírus com IC_{50} de 0,1427 $\mu\text{g/mL}$ *in vitro*.

4.3.3 – Composto 3

No espectro de RMN de ^1H (Figura 30), identificou-se um sinal simples em δ 5,90 ppm que integra para 2H, característico do grupo metilenodioxifenila ($\text{OCH}_2\text{O-Phe}$), outro em δ 3,46 ppm que integra para 3H, característico do grupo metoxila (OMe) e outro em δ 2,40 ppm que integra para 3H, característico do grupo N-metila (NMe).

Singletos com δ 6,50 e 6,85 ppm ($J=1\text{H}$) característicos de hidrogênios aromáticos na posição *para*, que podem ser atribuídos às posições 7 e 10 do anel A.

Dois dubletos largos em δ 5,61 ppm ($J=1\text{H}$) e 6,14 ppm ($J=1\text{H}$) indicam a presença de hidrogênios olefínicos na molécula (anel C). A constante de acoplamento calculada para estes dubletos foi de, aproximadamente, 10 Hz, o que permite concluir que os hidrogênios acoplam entre si na configuração *cis*. A diferença entre o deslocamento químico destes dois hidrogênios sugere que um deles se encontra mais próximo de um elemento mais eletronegativo, como o oxigênio do grupo metoxila.

A presença de dois dubletos em sistema AX (δ 4,96 ppm, $J=1\text{H}$; δ 4,65 ppm, $J=1\text{H}$) com constante de acoplamento grande ($^2J_{gem} = 14,7\text{ Hz}$) permite concluir que os hidrogênios acoplam entre si, o que caracteriza os hidrogênios da posição 6 (6α e 6β) do anel B.

Dois dubletos em δ 3,31 ppm e δ 2,68 ppm referem-se aos hidrogênios ligados a carbono saturado 12α e 12β . A constante de acoplamento geminal de 10,6 Hz, indica ocorrer acoplamento entre eles. Encontram-se mais blindados do que os hidrogênios do sistema AX. Sendo assim, é possível inferir que no anel B existe um heteroátomo mais próximo dos hidrogênios capaz de diminuir a densidade eletrônica dos hidrogênios da posição 6.

No entanto, o deslocamento químico observado (3,31 e 2,68 ppm) também indica a presença de outro heteroátomo (menos eletronegativo do que o presente no anel B) próximo aos hidrogênios da posição 12. Com base nos esqueletos estabelecidos

para os alcaloides de Amaryllidaceae e nas análises preliminares (CG-EM), atribuiu-se o oxigênio e o nitrogênio (do grupo NMe) como heteroátomos possíveis. Desta forma, os hidrogênios localizados próximos ao grupo NMe correspondem à posição 12 (12 α e 12 β).

Também foram verificados multipletos com δ 4,14 ppm ($J = 1\text{H}$), δ 2,23 ppm ($J = 1\text{H}$) e δ 1,63 ppm ($J = 1\text{H}$) e um singleto largo em δ 2,87 ppm ($J = 1\text{H}$) relacionados aos hidrogênios das posições 3, 4 α e 4 β do anel C.

Não foram encontrados sinais que pudessem ser atribuídos à posição 11, logo é possível inferir que esta posição contém um substituinte, que geralmente é uma hidroxila. As posições 6a, 8, 9, 10a e 10b referem-se a carbonos quaternários que não possuem hidrogênio, logo não são detectados pela técnica adotada.

Os dados de RMN de ^1H obtidos foram comparados com os disponíveis na literatura (Tabela 17) e encontraram-se em conformidade com os obtidos para o alcaloide tazetina (Figura 31).

Relata-se com muita frequência a presença deste alcaloide na família Amaryllidaceae, principalmente nas espécies do gênero *Narcissus* (BASTIDA et al., 2006). Contudo, sabe-se que a tazetina é, na verdade, um artefato de extração da pretazetina (Figura 32) que sofre rearranjo durante o processo de extração ácido-base (HAUGWITZ et al., 1965; GHOSAL et al., 1984; BASTIDA et al., 2011).

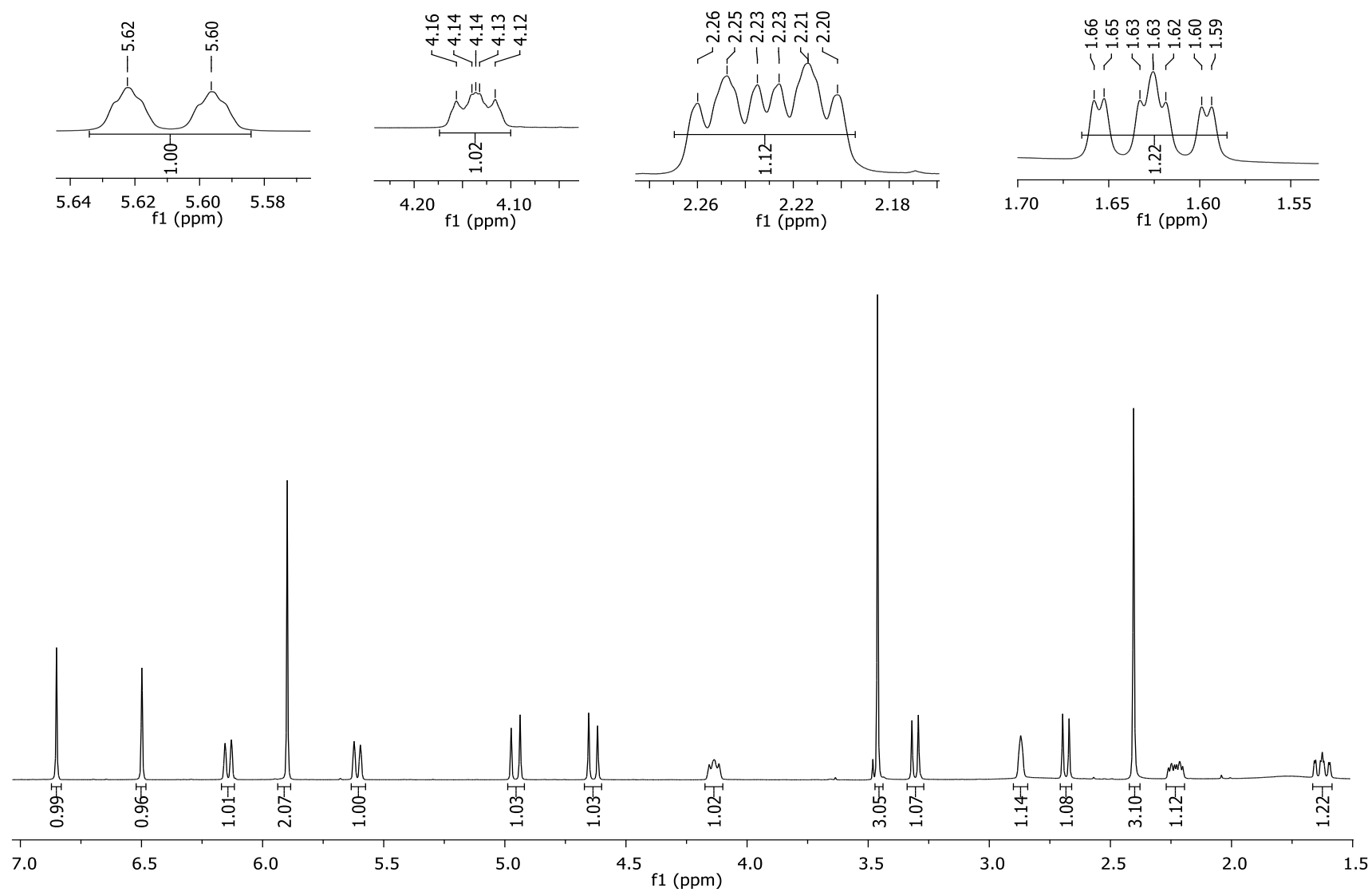


Figura 30: Espectro de RMN de ^1H do composto **3** com expansões (CDCl_3 , 400 MHz).

TABELA 17 - DADOS DE RMN de ^1H (CdCl_3 , 400 MHz) DO COMPOSTO **3** COMPARADOS COM A LITERATURA (CdCl_3 , 100 MHz) (GHOSAL et al., 1984).

Posição	δ_{H} (ppm) (<i>J</i> em Hz) Composto 3	δ_{H} (ppm) (<i>J</i> em Hz) literatura
H-1	5,61 / <i>d</i> (10,4)	5,60 <i>ddd</i> (10,5; 2,0; 1,5)
H-2	6,14 / <i>d</i> (10,4)	6,15 <i>ddd</i> (10,5; 2,0; 1,2)
H-3	4,14 <i>m</i>	4,13 <i>m</i>
H-4 α	2,23 <i>m</i>	2,20 <i>m</i>
H-4 β	1,63 <i>m</i>	1,60 <i>m</i>
H-4a	2,87 / <i>s</i>	2,83 <i>m</i>
H-6 α	4,96 <i>d</i> (14,7)	4,95 <i>dd</i> (14,7; 0,5)
H-6 β	4,64 <i>d</i> (14,7)	4,65 <i>d</i> (14,7)
H-7	6,50 <i>s</i>	6,50 <i>s</i>
H-10	6,85 <i>s</i>	6,85 <i>s</i>
H-12 α	3,31 <i>d</i> (10,6)	3,30 <i>d</i> (10,5)
H-12 β	2,68 <i>d</i> (10,6)	2,65 <i>d</i> (10,5)
OCH ₂ O	5,90 <i>s</i>	5,90 <i>s</i>
3-OMe	3,46 <i>s</i>	3,45 <i>s</i>
NMe	2,40 <i>s</i>	2,40 <i>s</i>

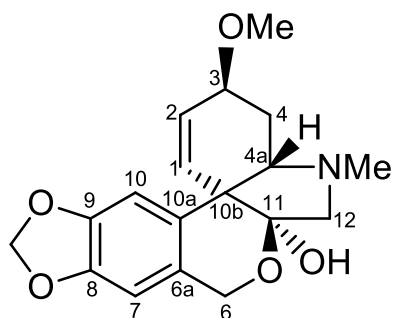


Figura 31: Estrutura química do alcaloide tazetina (**3**).

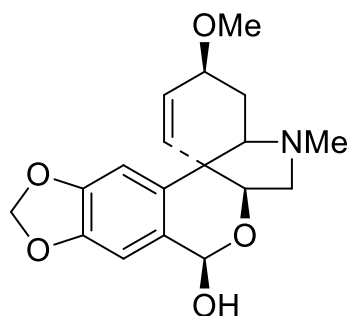


Figura 32: Estrutura do alcaloide pretazetina.

Hohmann e colaboradores (2002) observaram resultado mediano ($IC_{50}=7,85\mu\text{g/mL}$) para tazetina frente às linhagens de células L5178 de linfoma. Já Şener e colaboradores (2003) avaliaram atividade antimalária para alguns alcaloides, os resultados mostraram que galantamina e tazetina apresentaram baixa atividade contra o *Plasmodium falciparum*. Em 2010, McNulty e colaboradores realizaram testes de atividade inibitória da acetilcolinesterase empregando diversos alcaloides de Amaryllidaceae. Tazetina não apresentou atividade inibitória sobre esta enzima. De Andrade e colaboradores (2012) realizaram ensaios biológicos *in vitro* para determinação de atividade antiparasitária contra *Trypanossoma cruzi*, *Trypanossoma brucei rhodesiense*, *Leishmania donovani* e *Plasmodium falciparum*, de diversos alcaloides, incluindo a tazetina. No entanto, os resultados não foram significativos. Recentemente, Kaya e colaboradores (2017), avaliaram a atividade anti-inflamatória de alcaloides e extratos de *Galanthus cilicicus*. Apenas os extratos obtidos apresentaram resultados satisfatórios e não a tazetina isolada.

A atividade larvicida contra larvas do mosquito *Aedes aegypti* também foi testada por Masi e colaboradores (2017). Dentre os alcaloides testados, tazetina apresentou baixa taxa de mortalidade (20% em solução $0,1\mu\text{g.mL}^{-1}$).

4.3.4 – Composto 4

O espectro de RMN de ^1H para o composto **4** (Figura 33) indicou um dubleto em δ 6,03 ppm ($J = 2\text{H}$) característico dos hidrogênios do grupo metilenodioxifenila; um singlete que integra para 3 hidrogênios em δ 3,42 e outro em δ 2,52 o que indica a presença do grupo metoxila e N-metila, respectivamente.

Os singletos ($J = 1\text{H}$, cada) em δ 7,51 ppm e δ 6,75 ppm representam os dos hidrogênios aromáticos na posição *para* (um em relação ao outro) das posições 7 e 10 do anel A. O sinal mais desblindado indica que um dos hidrogênios encontra-se mais próximo de um elemento ou grupo mais eletronegativo como oxigênio ou carbonila.

Identificou-se os dubletos relacionados aos hidrogênios olefínicos em δ 5,47 ppm e δ 5,96 ppm correspondentes às posições 1 e 2 do anel C que acoplam entre si com $^3J_{vic} \sim 10\text{ Hz}$. O sinal mais desblindado em δ 5,96 ppm indica que o hidrogênio desta posição está próximo a três ligações de um átomo eletronegativo.

A ausência de sinais relacionados aos hidrogênios da posição 6, a desblindagem observada para o hidrogênio da posição 7 e as análises preliminares realizadas reforçam a possibilidade da presença de uma lactona no anel B. Com isso, conclui-se que o composto **4** possui esqueleto do tipo tazetina.

Os sinais em δ 2,54 ppm, δ 1,71 ppm, δ 3,12 ppm e δ 4,15 ppm correspondem aos hidrogênios ligados a carbonos saturados da posição 4 (4α e 4β), $4a$ e 3 do anel C. Apesar de estarem ligados a carbono saturado, os sinais encontram-se mais desblindados devido à proximidade com átomo mais eletronegativo como o oxigênio do grupo OMe, presente na posição 3, e o nitrogênio do grupo NMe ligado à posição $4a$.

Um duplo dubleto em δ 2,79 ppm e um duplo dubleto coalecido em δ 3,18 ppm indicam a presença de hidrogênios geminais das posições 12α e 12β . Esta afirmação pode ser confirmada pela constante de acoplamento geminal calculada

de, aproximadamente 10 Hz. Além disso, é possível concluir que esses hidrogênios acoplam com um hidrogênio vicinal (posição 11) representado pelo duplo dubleto em δ 4,45 ppm. Apenas é possível visualizar o duplo dubleto coalecido em δ 3,18 ppm através da deconvolução do espectro (Figura 34).

Após a comparação dos dados com os disponíveis na literatura (Tabela 18), observou-se grande similaridade com o alcaloide 3-epimacronina (Figura 35). Algumas diferenças na resolução dos sinais obtidos com os descritos na literatura estão relacionadas à frequência de operação do equipamento.

Poucos são os estudos de atividade biológica com resultados significativos descritos na literatura para este alcaloide. No entanto, ressalta-se o trabalho de Cortes e colaboradores (2015) que realizaram *docking* molecular em busca de inibidores da acetilcolinesterase a partir de extratos e alcaloides de Amaryllidaceae. Galantamina foi utilizada como padrão de comparação. Dos alcaloides testados, 3-epimacronina apresentou boa interação com alguns resíduos dos aminoácidos da enzima acetilcolinesterase. Os autores reforçaram a necessidade de aprofundamento nos estudos envolvendo derivados de 3-epimacronina, pois consideram sua estrutura promissora no desenvolvimento de fármacos mais seletivos contra a doença de Alzheimer.

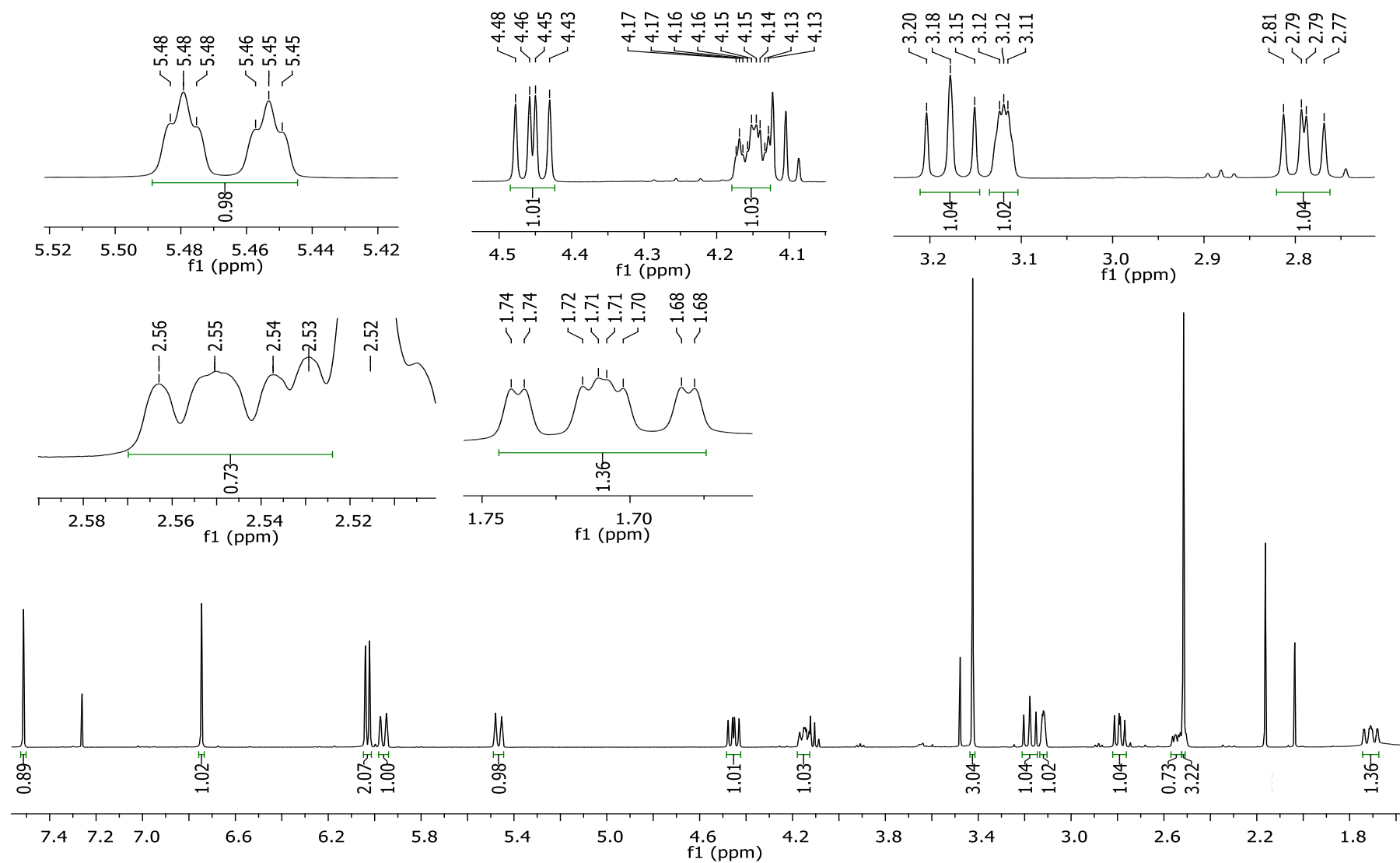


Figura 33: Espectro de RMN de ^1H do composto **4** com expansões (CDCl_3 , 400 MHz).

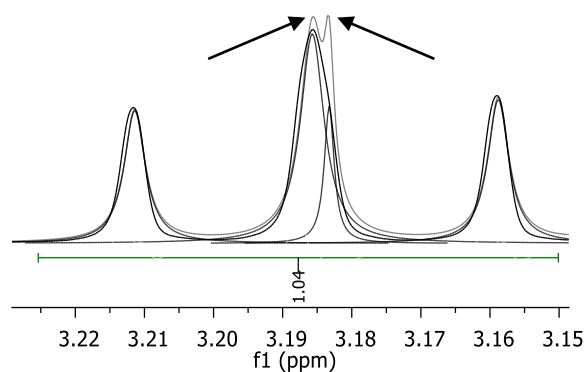


Figura 34: Deconvolução do sinal em δ 3,18 ppm para o composto **4**.

TABELA 18 - DADOS DE RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) DO COMPOSTO **4** COMPARADOS COM A LITERATURA (CDCl_3 , 100 MHz) (KIHARA et al., 1987)

Posição	δ_{H} (ppm) (<i>J</i> em Hz) Composto 4	δ_{H} (ppm) (<i>J</i> em Hz) literatura
H-1	5,47 <i>dt</i> (10,4; 1,6)	5,44 <i>ddd</i> (10; 2; 2)
H-2	5,96 <i>d</i> (10,4)	5,97 <i>d</i> (10)
H-3	4,15 <i>m</i>	4,12 <i>m</i>
H-4 α	1,71 <i>ddd</i> (11,8; 9,6; 1,8)	1,70 <i>m</i>
H-4 β	2,54 <i>m</i>	2,55 <i>m</i>
H-4a	3,12 <i>m</i>	3,10 <i>m</i>
H-7	7,51 <i>s</i>	7,52 <i>s</i>
H-10	6,75 <i>s</i>	6,73 <i>s</i>
H-11	4,45 <i>dd</i> (11,0; 7,8)	4,43 <i>dd</i> (11; 8)
H-12 α	3,18 <i>dd</i> (10,8; 9,6)	3,16 <i>dd</i> (11; 10)
H-12 β	2,79 <i>dd</i> (10,0; 7,8)	2,76 <i>dd</i> (10; 8)
OCH ₂ O	6,03 <i>d</i> (7,0)	6,01 <i>s</i>
OMe	3,42 <i>s</i>	3,40 <i>s</i>
NMe	2,52 <i>s</i>	2,50 <i>s</i>

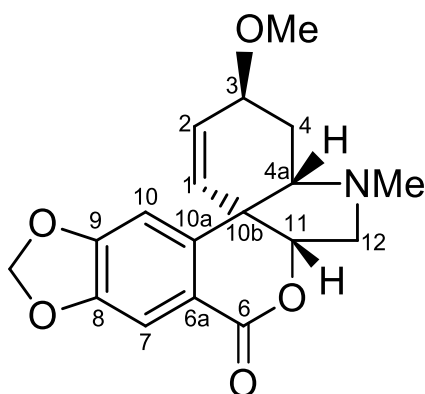


Figura 35: Estrutura química do alcaloide 3-epimacronina (**4**).

4.3.5 – Composto 5

O espectro de RMN de ^1H referente ao composto **5** (Figura 36) apresentou como principais sinais, dois singletos ($J = 3\text{H}$) característicos de grupos metoxilas (δ 3,96 ppm e δ 3,94 ppm) e outro singlete ($J = 3\text{H}$) correspondente ao grupo N-metila (δ 2,02 ppm). Não foram observados sinais relacionados ao grupo metilenodioxifenila.

Os hidrogênios aromáticos na posição *para* do anel A estão representados pelos singletos em δ 7,56 ppm e δ 7,04 ppm. Com base nestes deslocamentos, conclui-se que existe um átomo mais eletronegativo próximo e no mesmo plano (periplanar) do hidrogênio mais desblindado (BASTIDA et al, 2011). Na região dos hidrogênios olefínicos, identificou-se apenas um multiplete em δ 5,52 ppm. Logo, não há hidrogênio olefínico vicinal a este.

Assim como observado para o composto **4**, não foram detectados sinais relacionados aos hidrogênios da posição 6. Desta forma, reforça-se a possibilidade da presença de uma lactona no anel B (BASTIDA et al., 2006). Com base nos dados acima, nas análises preliminares e na literatura, concluiu-se que o composto é do tipo homolicorina.

Segundo Bastida e colaboradores (2006), os alcaloides do esqueleto tipo homolicorina da série lactona apresentam de dois a três substituintes oxigenados no anel aromático. Desta forma, as metoxilas identificadas são os substituintes das posições 8 e 9 do anel A.

É possível observar um acoplamento com $^3J_{4a,10b} = 18\text{ Hz}$, o que indica uma relação *trans*-diaxial entre os hidrogênios das posições 4a e 10b (junção B/C) (BASTIDA et al., 2006). Os sinais em δ 3,18 ppm e δ 2,28 ppm referem-se aos hidrogênios 12α e 12β , respectivamente. A diferença entre os deslocamentos químicos se deve ao fato da relação *cis* entre o hidrogênio 12α e o par de elétrons livres do nitrogênio do grupo N-metila (BASTIDA et al., 2011).

Os hidrogênios 2 α e 2 β aparecem como multipeto em δ 2,62 ppm. O mesmo ocorre com os hidrogênios 11 α e 11 β (δ 2,53 ppm). O multipeto em δ 4,80 ppm corresponde ao hidrogênio da posição 1. Observa-se que muitos hidrogênios não ressoaram bem. Isso pode estar relacionado à característica da molécula ou a problemas no *shimming*, responsável por eliminar a falta de homogeneidade no campo magnético aplicado pelo equipamento de ressonância magnética nuclear.

Com base nos dados obtidos e de acordo com a literatura (Tabela 19), identificou-se o composto **5** como homolicorina (Figura 37).

TABELA 19 - DADOS DE RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) DO COMPOSTO **5** COMPARADOS COM A LITERATURA (CDCl_3 , 200 MHz) (BASTIDA et al., 1987)

Posição	δ_{H} (ppm) (J em Hz) Composto 5	δ_{H} (ppm) (J em Hz) literatura
H-1	4,80 <i>m</i>	4,81 <i>ddd</i> (4,2; 1,8; 1,7)
H-2 α/β	2,62 <i>m</i>	2,49 <i>m</i>
H-3	5,52 <i>m</i>	5,50 <i>m</i>
H-4a	2,74 <i>l d</i> (18,0)	2,72 <i>dd</i> (9,6; 2,0)
H-7	7,56 <i>s</i>	7,57 <i>s</i>
H-10	7,04 <i>s</i>	6,99 <i>s</i>
H-10b	2,74 <i>l d</i> (18,0)	2,64 <i>dd</i> (9,6; 1,8)
H-11 α/β	2,53 <i>l m</i>	2,61 – 2,67 <i>m</i>
H-12 α	3,18 <i>s</i>	3,14 <i>ddd</i> (9,2; 5,3; 4,1)
H-12 β	2,27 <i>dd</i> (18,4; 8,8)	2,24 <i>dd</i> (18,0; 9,2)
8-OMe	3,96 <i>s</i>	3,96 <i>s</i>
9-OMe	3,94 <i>s</i>	3,95 <i>s</i>
NMe	2,02 <i>s</i>	2,00 <i>s</i>

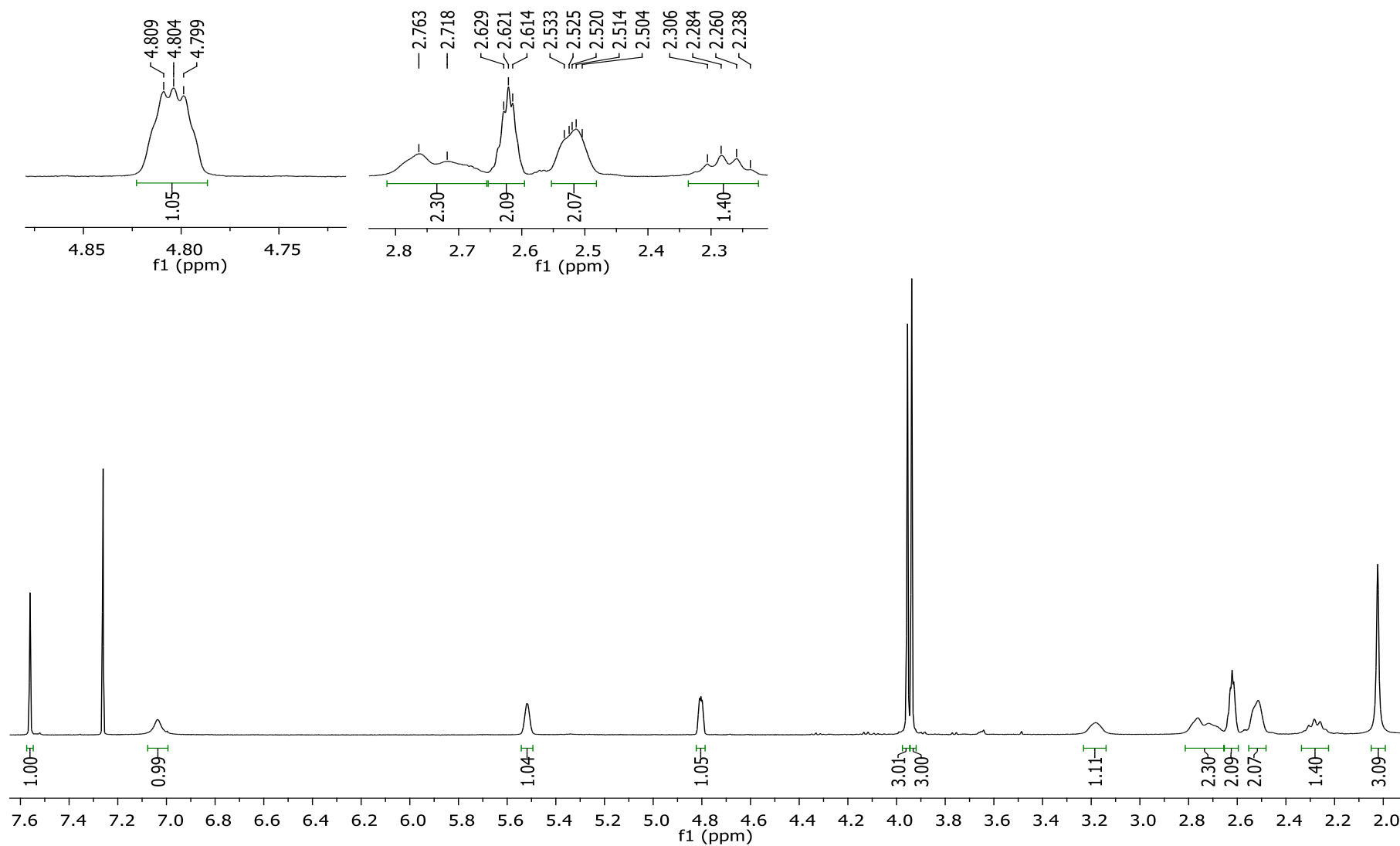


Figura 36: Espectro de RMN de ^1H do composto **5** com expansões (CDCl_3 , 400 MHz).

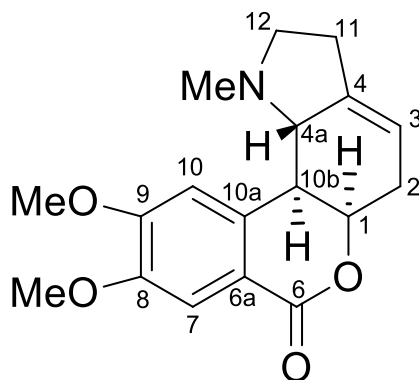


Figura 37: Estrutura química do alcaloide homolitorina (5).

Muitas atividades biológicas são atribuídas à homolitorina e seus derivados. Existem relatos atividade inibitória moderada no crescimento de uma variedade de tumores tanto *in vivo* e *in vitro* e efeito hipotensor em ratos normotensos (ANTOUN et al., 1993; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2000; FERNNELL; VAN STADEN, 2001).

Testes realizados por Szlávik e colaboradores (2004) comprovaram que homolitorina efetivamente inibe a replicação do vírus HIV-1 *in vitro* ($IC_{50}=7,3 \mu\text{g/mL}$) e apresenta baixo índice terapêutico (IT = 1,8).

Dentre os derivados da homolitorina, a licorenina (Figura 38a) apresentou efeitos vasodepressores em ratos quando administrada por via intra-arterial em concentrações entre 62,5 e 500 mg (MIYASAKA; HIRAMATSU, 1980). Ghosal e colaboradores (1985) reportaram atividade analgésica para licorenina. A hipeastrina (Figura 38b) mostrou atividade antifúngica contra *Candida albicans* (EVIDENTE et al., 2004).

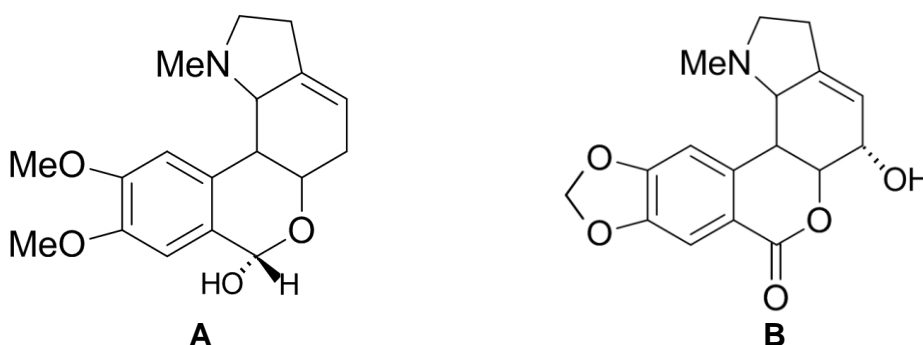


Figura 38: Estruturas químicas de derivados de homolitorina (**a**-licorenina, **b**-Hipeastrina).

4.3.6 – Composto 6

Este composto apresentou espectro de RMN de ^1H (Figura 39) com muitos sinais semelhantes ao composto **5**. No entanto, foi identificado mais um sinal simples com δ 3,99 ppm ($J=3\text{H}$) relacionado ao grupo metoxila mais desblindado (devido à proximidade com um átomo mais eletronegativo) e apenas um sinal na região dos hidrogênios aromáticos.

Devido às semelhanças encontradas entre os espectros dos compostos **5** e **6**, foi possível concluir que o alcaloide **6** é do tipo homolicorina, porém com mais uma substituição no anel aromático (A). De acordo com Bastida e colaboradores (2006), é comum alcaloides do tipo homolicorina da série lactona apresentarem de dois a três substituintes no anel aromático.

Conforme observado por Hawksworth e colaboradores (1965), a terceira metoxila aromática dos alcaloides do tipo homolicorina corresponderia à posição 7. Composto semelhante foi encontrado por Bessa (2015) que realizou análises de RMN de ^1H uni e bidimensionais a fim de verificar a posição da terceira metoxila encontrada e constatou estar na posição 7.

Uma vez que não existem na literatura informações acerca da possibilidade da terceira metoxila encontrar-se na posição 10, atribuiu-se a posição 7 para a terceira metoxila encontrada.

Comparando os resultados constantes na literatura (Tabela 20) com os obtidos, identificou-se o composto **6** como albomaculina (Figura 40).

Apesar do isolamento deste alcaloide ter ocorrido em 1956, somente em 2014 dados de RMN de ^1H uni e bidimensionais para este composto foram publicados (BRIGGS et al., 1956; DE ANDRADE et al., 2014).

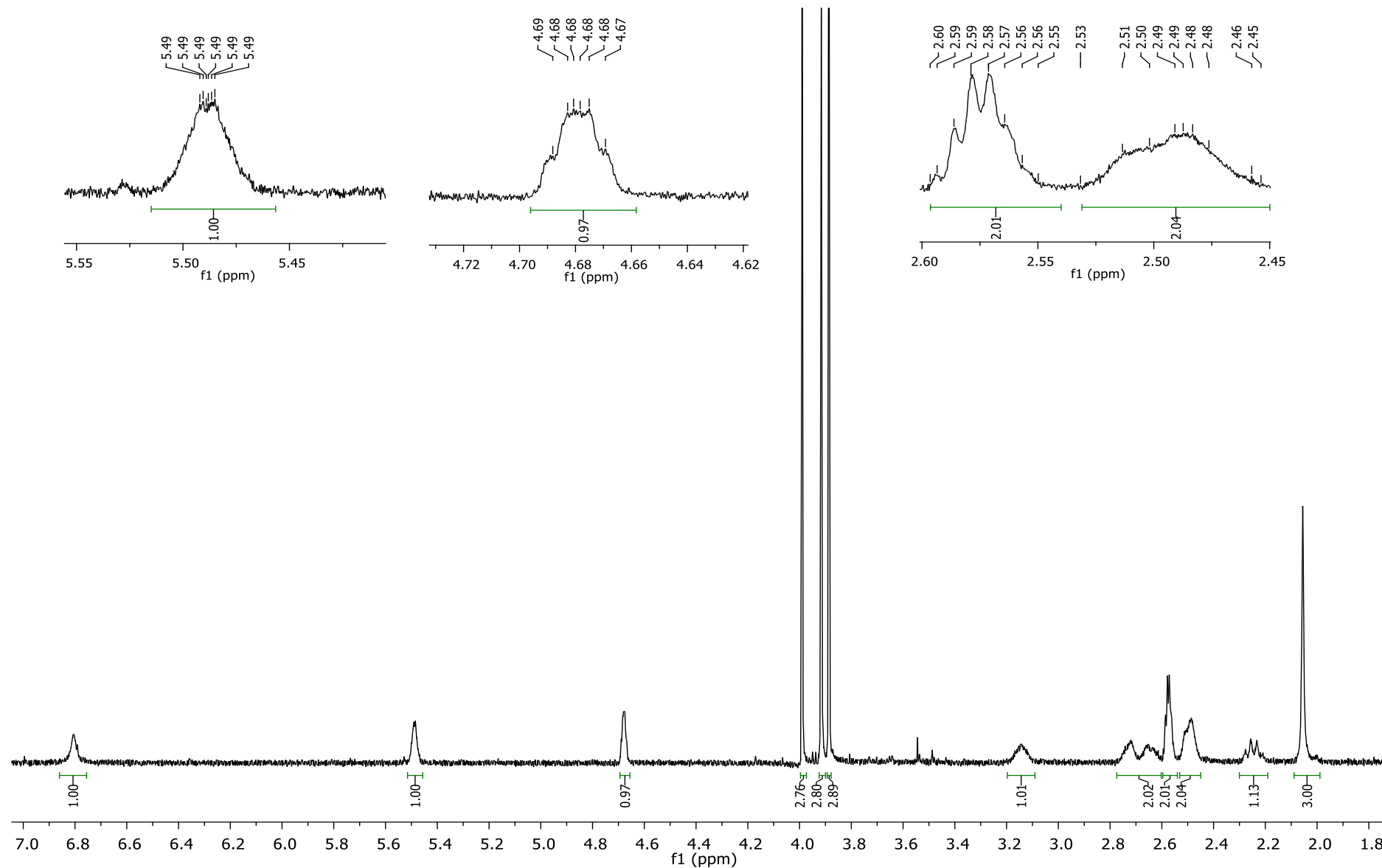


Figura 39: Espectro de RMN de ^1H do composto **6** com expansões (CDCl_3 , 400 MHz).

TABELA 20 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **6** comparados com a literatura (CDCl_3 , 400 MHz) (DE ANDRADE et al., 2014)

Posição	δ_{H} (ppm) (<i>J</i> em Hz) Composto 6	δ_{H} (ppm) (<i>J</i> em Hz) literatura
H-1	4,68 <i>l m</i>	4,68 <i>l m</i>
H-2 α/β	2,55 – 2,60 <i>l m</i>	2,55 – 2,60 <i>l m</i>
H-3	5,49 <i>l m</i>	5,48 <i>l m</i>
H-4a	2,70 <i>l d</i> (18,0)	2,72 <i>d</i> (10,0)
H-10	6,81 <i>s</i>	6,78 <i>s</i>
H-10b	2,70 <i>l d</i> (18,0)	2,63 <i>d</i> (10,0)
H-11 α/β	2,45 - 2,53 <i>l m</i>	2,45 – 2,53 <i>l m</i>
H-12 α	3,15 <i>l s</i>	3,13 <i>ddd</i> (9,6; 7,2; 3,6)
H-12 β	2,25 <i>q</i> (9,6)	2,23 <i>q</i> (9,6)
7-OMe	3,99 <i>s</i>	3,99 <i>s</i>
8-OMe	3,89 <i>s</i>	3,89 <i>s</i>
9-OMe	3,92 <i>s</i>	3,91 <i>s</i>
NMe	2,06 <i>s</i>	2,05 <i>s</i>

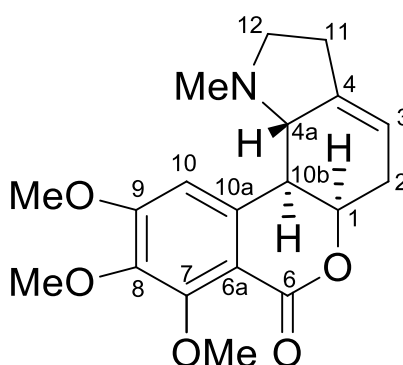


Figura 40: Estrutura química do alcaloide albomaculina (**6**).

Poucos artigos que mencionam albomaculina estão disponíveis na literatura. A maioria data de 1956 a 1966. Relata-se o isolamento, síntese e degradação deste composto.

Somente em 2007 houve um estudo de atividade biológica envolvendo este alcaloide. Wang e colaboradores realizaram dois testes de atividade biológica: um para avaliação da atividade antiviral anti-TMV (vírus do mosaico do tabaco) e outro para avaliação da inibição da acetilcolinesterase. Albomaculina mostrou-se ativa contra TMV e inativa na inibição da acetilcolinesterase.

4.3.7 – Composto 7

O espectro de RMN de ^1H referente ao composto **7** (Figura 41) não apresentou sinais que pudessem estar relacionados à presença de grupo metoxila. Um singlete com δ 6,01 ppm com integração para 2H indica a presença do grupo metilenodioxifenila.

Semelhantemente ao ocorrido para o composto **2**, foram observados vários desdobramentos de sinais na região do espectro correspondente aos hidrogênios aromáticos. Foi possível identificar hidrogênios que acoplam entre si na posição *orto* e *meta* devido à magnitude de suas constantes de acoplamento. Desta forma, os hidrogênios das posições 1, 2, 3 e 4 encontram-se em outro anel aromático (anel C).

Um singlete em 2,75 ppm ($J=3\text{H}$) indica a presença do grupo N-metila, mais desblindado do que normalmente é encontrado nos alcaloides de Amaryllidaceae. Isso indica a presença de átomo mais eletronegativo ou ligações insaturadas próximas a ele. Com isso, foi possível verificar que próximo ao grupo N-metila encontra-se o anel aromático C.

Dois dubletos em 4,28 ppm ($J=1\text{H}$) e 4,21 ppm ($J=1\text{H}$) com constante de 12,0 Hz indicam que os hidrogênios são geminais e acoplam entre si. Logo, estes hidrogênios encontram-se na posição 6 já que não existem mais sinais que pudessem direcionar para hidrogênios presentes no anel D, que neste caso não está presente na molécula.

Foram observados sinais simples correspondentes aos hidrogênios aromáticos com δ 7,02 e δ 6,68 ppm logo foi possível constatar que na molécula existem hidrogênios aromáticos *para* orientados presentes no anel A (posições 7 e 10). O hidrogênio com sinal em 7,02 ppm apresenta-se mais desblindado devido à proximidade com átomo mais eletronegativo.

Como a posição 6 possui dois hidrogênios e um dos hidrogênios *para* orientados do anel A encontra-se mais desblindado, concluiu-se que a molécula não possui anel B.

Atribuiu-se à presença de uma hidroxila na posição 6 o fato da desblindagem do sinal referente ao hidrogênio com δ 7,02 ppm (hidrogênio da posição 7).

Comparando os resultados constantes na literatura (Tabela 21) com os obtidos, identificou-se o composto **7** como ismina (Figura 42).

Com relação à diferença entre os deslocamentos dos hidrogênios geminais da posição 6, Bastida e colaboradores (2006) explicaram que devido à rotação restrita em torno da ligação biarílica, os hidrogênios desta posição não são magneticamente equivalentes.

TABELA 21 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **7** comparados com a literatura (CDCl_3 , 200 MHz) (SUAU et al., 1990).

Posição	δ_{H} (ppm) (<i>J</i> em Hz) Composto 7	δ_{H} (ppm) (<i>J</i> em Hz) literatura
H-1	7,00 <i>dd</i> (7,4; 1,6)	6,98 <i>dd</i> (7,3; 1,7)
H-2	6,83 <i>ddd</i> (7,4; 7,4; 1,1)	6,81 <i>ddd</i> (7,3; 7,3; 1,1)
H-3	7,30 <i>ddd</i> (8,1; 7,4; 1,6)	7,28 <i>ddd</i> (8,1; 7,3; 1,7)
H-4	6,75 <i>dd</i> (8,1; 1,1)	6,73 <i>dd</i> (8,1; 1,1)
H-6 α	4,28 <i>d</i> (12,0)	4,26 <i>d</i> (12)
H-6 β	4,21 <i>d</i> (12,0)	4,20 <i>d</i> (12)
H-7	7,02 <i>s</i>	7,00 <i>s</i>
H-10	6,68 <i>s</i>	6,67 <i>s</i>
OCH ₂ O	6,01 <i>s</i>	5,99 <i>s</i>
NMe	2,75 <i>s</i>	2,73 <i>s</i>

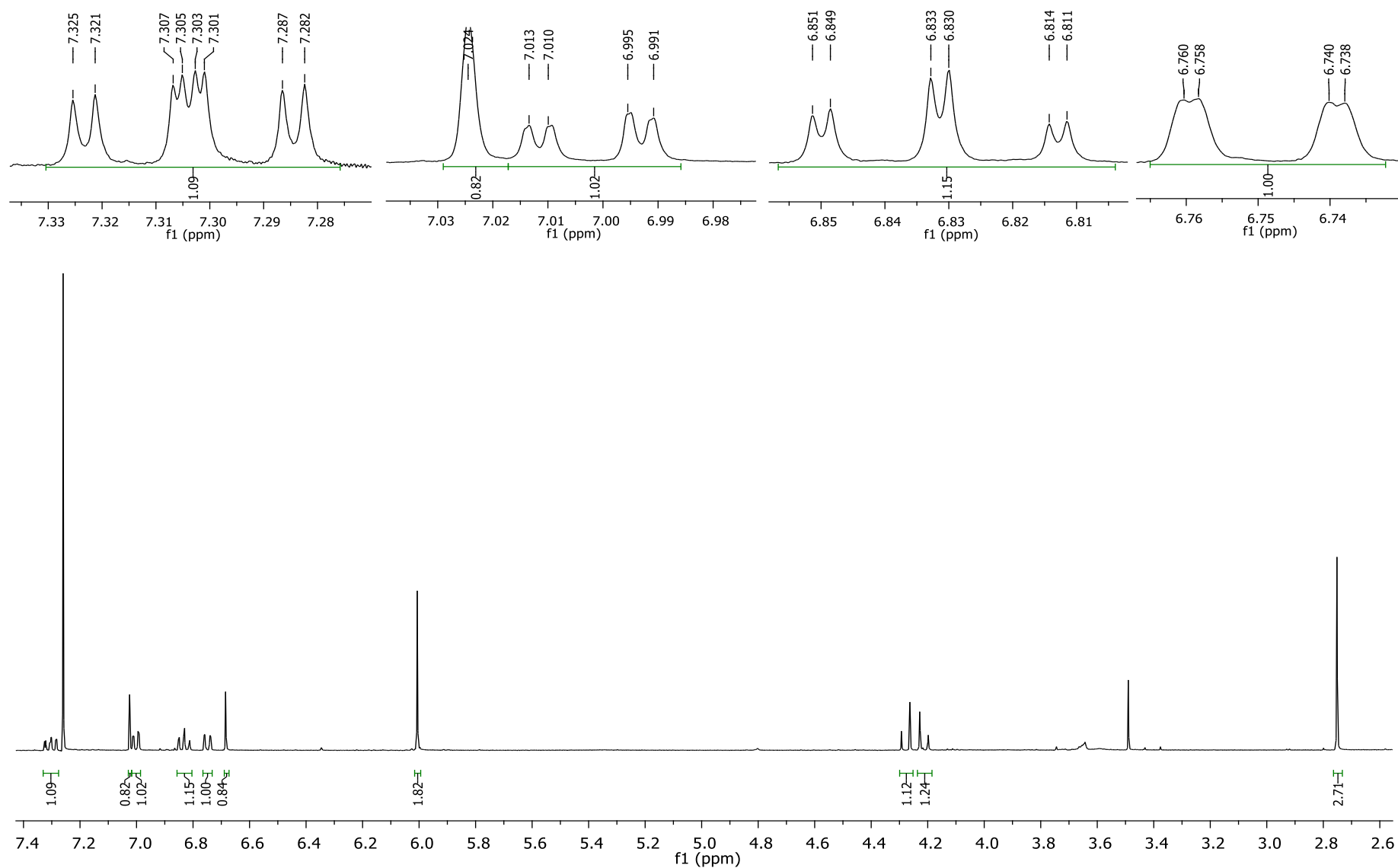


Figura 41: Espectro de RMN de ^1H do composto **7** com expansões (CDCl_3 , 400 MHz).

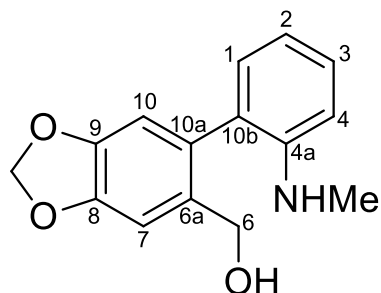


Figura 42: Estrutura química do alcaloide ismina (7).

Estudos realizados mostraram que ismina era produto de transformação da série crinina-haemantamina. Um ano depois, foi verificado que este alcaloide também poderia ser obtido naturalmente durante etapas posteriores à biossíntese da narciclasina (FUGANTI; MAZZA, 1972; FUNGATI, 1973).

Pesquisas mostram que ismina possui efeito hipotensor significativo sobre a pressão arterial em ratos normotensos (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2000) e atividade citotóxica contra linhagens de células humanas de hepatocarcinoma HepG2 e linfoma Molt 4 (WENIGER et al., 1995).

5 – CONCLUSÃO

Os métodos empregados para a extração e isolamento dos alcaloides foram satisfatórios. Observou-se melhor separação dos compostos quando a técnica de cromatografia em coluna aberta foi intercalada com a cromatografia por exclusão.

Licorina e tazetina são os alcaloides mais abundantes nas raízes da espécie pesquisada. Além destes compostos, foram isolados 3-epimacronina, homolicorina, albomaculina, ismina e trisfaeridina.

As análises realizadas por CG-EM demonstraram que as raízes da espécie *Worsleya procera* são uma rica fonte de alcaloides que podem ser empregados como protótipos em sínteses e modelagem molecular em busca de substâncias ativas mais seletivas, além de contribuir para quimiotaxonomia da espécie.

REFERÊNCIAS

- ANGIOSPERM phylogeny website. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/welcome.html>>. Acesso em: 27 jun. 2016.
- ANTOUN, M. D.; MENDONZA, N. T.; RÍOS, Y. R. Cytotoxicity of *Hymenocallis expansa* alkaloids. **Journal of natural products**, v. 56, n. 8, p. 1423-1425, 1993.
- ASSOCIAÇÃO DE PRESERVAÇÃO DO MEIO AMBIENTE. Santa Catarina (Estado). **Flora**. Disponível em: <<http://www.apremavi.org.br/mata-atlantica/entrando-na-mata/flora/>>. Acesso em: 01 jun. 2015.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. da.; Biodiversidade: fonte potencial para descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BASTIDA, J.; LLABRÉS, J. M.; VILADOMAT, F.; CODINIA, C. *Narcissus* alkaloids, III. 9-O-demethylhomolycorine from *Narcissus confusus*. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 2, p. 199-202, 1987.
- BASTIDA, J.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; RUBIRALTA, M.; QUIRION, J-C.; HUSSON, H-P.; MA, G-E. *Narcissus* alkaloids, XIII. Complete assignment of the NMR spectra of papyramine and 6- epi-papyramine by two-dimensional NMR spectroscopy. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 1456-1462, 1990.
- BASTIDA, J., LAVILLA, R., VILADOMAT, F. Chemical and biological aspects of *Narcissus alkaloids*. In: Cordell, G.A. (Ed.), **The Alkaloids**, v. 63. Amsterdam : Elsevier, p. 87–179, 2006.
- BASTIDA, J.; BERKOV, S.; TORRAS, L.; PIGNI, N. B.; DE ANDRADE, J. P.; MARTÍNEZ, V.; CODINA, C.; VILADOMAT, F. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. **Recent Advances in Pharmaceutical Sciences**, p. 65-100, 2011.
- BESSA, Carliani Dal Piero Betzel Bessa. **Estudo químico e biológico em alcaloides de *Hippeastrum aulicum* (KER GAWL.) HERB: uma espécie da família Amaryllidaceae**. 2015. 112 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação Química, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2015.
- BERKOV, S.; EVSTATIEVA, L.; POPOV, S.; Alkaloids in bulgarian *Pancratium maritimum* L. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 59, n. 1-2, p. 65-69, 2004.
- BERKOV, S.; BASTIDA, J.; SIDJIMOVA, B.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Phytochemical differentiation of *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii* (Amaryllidaceae): A case study. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 8, p. 638-645, 2008.

BERKOV, S.; BASTIDA, J.; TSVETKOVA, R.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Alkaloids from *Sternbergia colchiciflora*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64, n. 5-6, p. 311-316, 2009.

BOURGUAD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, n. 161, p. 839-851, 2001.

BRAGA, F.C.; CASTILHO, R.O. Potencialidades do cerrado como fonte de substâncias bioativas e de espécies medicinais para o desenvolvimento de fitoterápicos. In: de SOUZA, G. H. B.; de MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia: coletânea científica**, 1 ed. Ouro Preto, Editora UFOP, 2011, p. 295-318.

BRASIL. Portaria do Ministério do Meio Ambiente nº 443, de 17 de dezembro de 2014. Reconhece como espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção aquelas constantes na "Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 18 dez. 2014. Seção 1, p. 110 a 121.

BRIGGS, C. K.; HIGHET, P. F.; HIGHET, R. J.; WILDMAN, W. C. Alkaloids of the Amaryllidaceae. VII. Alkaloids containing the hemiacetal or lactone group. **Journal of the American Chemical Society**, v.78, p. 2899-2904, 1956.

BRINE, N. D.; CAMPBELL, W. E.; BASTIDA, J.; HERRERA, M. R.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; SMITH, P. J. A dinitrogenous alkaloid from *Cyrtanthus obliquus*. **Phytochemistry**, v. 6, n. 4, p. 443-447, 2002.

CAMPBELL, W. E.; NAIR, J. J.; GAMMON, D. W.; BASTIDA, J.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; SMITH, P. J.; ALBRECHT, C. F. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from *Brunsvigia littoralis*. *Planta medica*, v. 64, n. 1, p. 91-93, 1998.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais, conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, supl. 1, p. 99-105, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v21_n1/3475>. Acesso em: 6 abr. 2015.

CEDRÓN, J. C.; GUTIÉRREZ D.; FLORES, N.; RAVELO, A. G.; ESTÉVEZ-BRAUN, A. Synthesis and antiplasmodial activity of lycorine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 13, p. 4694-4701, 2010.

CHASE, M. W.; REVEAL, J. L.; FAY, M. F. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. **Bot. J. Linn. Soc.** v. 161, n. 2, p. 132-136, 2009.

CHEESMAN, L.; NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Antibacterial activity of crinane alkaloids from *Boophane disticha* (Amaryllidaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 405-408, 2012.

CHINSEMBU, K. C. Tuberculosis and nature's pharmacy of putative anti-tuberculosis agents. **Acta Tropica**, v. 153, p. 46-56, 2016.

CODINA, C.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; FERNÁNDEZ, J. M.; BERGOÑÓN, S.; RUBIRALTA, M.; QUIRION, J. C. Alkaloids from *Narcissus muñozzi-garmendii*Æ. **Phytochemistry**, v. 32, n. 5, p. 1354-1356, 1993.

COLL, J. C.; BOWDEN, B. F. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 5, p. 934-936, 1986.

COLLINS, C. H. Separações em colunas abertas: cromatografia por exclusão e por bioafinidade. **Scientia Chromatographica**, n. 3, v. 2, p. 107-114, 2011.

CORTES, N.; ALVAREZ, R.; OSORIO, E. H.; ALZATE, F.; BERKOV, S.; OSORIO, E. Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, p. 222-228, 2015.

CSEKE, L. J.; SETZER, W. N.; VOGLER, B.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B. Traditional, analytical and preparative separations of natural products. In: CSEKE et al., **Natural products from plants**. 2. ed. New York:Taylor & Francis Group, 2006, p. 263-317.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. The families of the Monocotyledons: structure, evolution, and taxonomy, Berlin: **Springer-Verlag**, p.199-206. 1985.

DE ANDRADE, J. P.; PIGNI, N. B.; TORRAS-CLAVERIA, L.; BERKOV, S.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J. Bioactive alkaloid extracts from *Narcissus broussonetti*: mass spectral studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 13-25, 2012.

DE ANDRADE, J. P.; GUO, Y.; FONT-BARDIA, M.; CALVET, T.; DUTILH, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; NAIR, J. J.; ZUANAZZI, J. A. S.; BASTIDA, J. Crinine-type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptratum*. **Phytochemistry**, v. 103, p. 188-195, 2014.

DE ANDRADE, Jean Paulo. **Estudio de la composición alcaloídica de *Narcissus broussonetti* y de tres especies brasileñas del género *Hippeastrum* (Amaryllidaceae)**. 2014. 174 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais) – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Biologia Vegetal, Universidade de Barcelona, Espanha, 2014.

DE MORAES, Miguel D'Ávila. **Conservação e manejo de *Worsleya rayneri* (Amaryllidaceae): uma espécie de campos de altitude ameaçada de extinção**. 2009. 102 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Escola Nacional de Botânica Tropical e Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery, **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.

DUTILH, J.H.A. Amaryllidaceae In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; MELHEM, T.S.; MARTINS, S.E.; KIRIZAWA, M.; GIULIETTI, A.M. (eds.) **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. v. 4. São Paulo: Instituto de Botânica, 2005. p. 244-256.

DUTILH, J. H.; FERNANDEZ, E. P.; DE PENEDO, T. S. A.; DE MORAES, M. M. V. de; MESSINA, T. Amaryllidaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. p. 126-139. Disponível em: <<http://cncflora.jbrj.gov.br/arquivos/arquivos/pdfs/LivroVermelho.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2015.

DUTILH, J. H.; OLIVEIRA, R. S. Amaryllidaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB33556>>. Acesso em: 31 mai. 2015.

ELDEEN, I. M. S.; ELGORASHI, E. E.; VAN STADEN, J. Antibacterial, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in South African traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 457-464, 2005.

ELGORASHI, E. E.; VAN STADEN, J. Pharmacological screening of six Amaryllidaceae species. **Journal of ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 27-32, 2004.

EVIDENTE, A.; CICALA, M. R.; GIUDICIANNI, I.; RANDAZZO, G.; RICCIO, R. ¹H and ¹³C nmr analysis of lycorine and α -dihydrolycorine. **Phytochemistry**, v. 22, n. 2, p. 581-584, 1983.

EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; ABOU-DONIA, A. H.; TOUEMA, S. M.; HAMMODA, H. M.; SHAWKY, E.; MOTTA, A. (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. **Phytochemistry**, v. 65, n. 14, p. 2113-2118, 2004.

EVIDENTE, A.; KIREEV, A. S.; JENKINS, A. R.; ROMERO, A. E.; STEELANT, W. F. A.; VANSLAMBROUK, S.; KORNIENKO, A. Biological evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design. **Planta Med.**, v. 75, n. 5 p. 501-507, 2009.

FENNELL, C. W.; VAN STADEN, J. Crinum species in traditional and modern medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, n. 1, p. 15-26, 2001.

FUGANTI, C. Further Information on the biosynthesis of the alkaloid ismine. **Tetrahedron Letters**, v. 14, n. 20, p. 1785-1788, 1973.

FUGANTI, C.; MAZZA, M. The absolute configuration of narciclasine: a biosynthetic approach. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 4, p. 239-239, 1972.

GHOSAL, S.; KUMAR, Y.; SINGH, S. Glucosyloxy alkaloids from *Pancratium biflorum*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 5, p. 1167-1171, 1984.

GHOSAL, S.; SAINI, K. S.; RAZDAN, S. Crinum alkaloids: their chemistry and biology. **Phytochemistry**, 24, p. 2141-2156, 1985.

GRAEFF, Orlando. **Worsleya rayneri em seu habitat**. 2014. 3 fotografias. Disponível em: <http://expedicaofitogeografica2012.blogspot.com.br/2014_12_01_archive.html>. Acesso em 02 ago. 2016.

GRAEFF, Orlando. **Plântula de Worsleya rayneri**. 2014. 1 fotografia. Disponível em: <http://expedicaofitogeografica2012.blogspot.com.br/2014_12_01_archive.html>. Acesso em 02 ago. 2016.

GIORDANI, R. B.; JUNIOR, C. O. R.; DE ANDRADE, J. P.; BASTIDA, J.; ZUANAZZI, J. A. S.; TASCA, T.; de ALMEIDA, M. V. Lycorine derivatives against *Trichomonas vaginalis*. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 80, n. 1, p. 129-133, 2012.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22 - 24, p. 2831-2846, 2007.

HARVEY, A. L. The pharmacology of galanthamine and its analogues. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 68, n. 1, p. 113-128, 1995.

HARVEY, A. L.; EBEL-EDRADA, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature**, n. 14, p. 111-129, 2015.

HAUGWITZ, R. D.; JEFFS, P. W.; WENKERT, E. Proton magnetic resonance studies of some Amaryllidaceae alkaloids of the 5-10b-ethanophenanthridine series and of criwelline and tazettine. **Journal of the Chemical Society**, n. 358, 1965.

HAWKSWORTH, W. A.; JEFFS, P. W.; TIDD, B. K.; TOUBE, T. P. The alkaloids of the Amaryllidaceae. Part XII. The aromatic oxygenation patterns and stereochemistry of some trioxyaryl alkaloids of the hemiacetal and lactone series. **Journal of Chemistry Society**, p.1991-2001, 1965.

HENRIQUES, A. T.; LLIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcaloides: generalidade e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre:Editora da UFRGS e Editora da UFSC, 2004, p. 765-791.

HE, J.; QI, W. B.; WANG, L.; TIAN, J.; JIAO, P. R.; LIU, G. Q.; YE, W. C.; LIAO, M. Amaryllidaceae alkaloids inhibit nuclear-to-cytoplasmic export of ribonucleoprotein

(RNP) complex of highly pathogenic avian influenza virus H5N1. **Influenza and other respiratory viruses**, v. 7, n. 6, p. 922-931, 2012.

HOHMANN, J.; FORGO, P.; MOLNÁR, J.; WOLFARD, K.; MOLNÁR, A.; THALHAMMER, T.; MÁTHÉ, I.; SHARPLES, D. Antiproliferative Amaryllidaceae alkaloids isolated from the bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis x festalis*. **Planta Médica**, v.68, n. 5, p. 454 – 457, 2002.

IRWIN, R. L.; SMITH III, H. J. Cholinesterase inhibition by galanthamine and lycoramine. **Biochemical Pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 147-148, 1960.

JIN, Z. Amaryllidaceae and Sceleritium alkaloids. **Natural Products Reports**, v. 33, p. 1318-1343, 2016.

KAUFMAN, P. B.; CSEKE, L. J.;VOGLER, B. SETZER, W. N.; KIRAKOSYAN, A. Traditional, analytical, and preparative separations of natural products. In: BRIELMANN, H. L.; KAUFMAN, P. B.; DUKE, J. A.; CSEKE, L. J.; WARBER, S. L.; KIRAKOSYAN, A. **Natural products from plant**. 2 ed. CRC Press, 2006. p. 263-317.

KAYA, G. I.; UZUN, K.; BOZKURT, B.; ONUR, M. A.; SOMER, N. U.; GLATZEL, D. K.; FÜRST, R. Chemical characterization and biological activity of an endemic Amaryllidaceae species: *Galanthus cilicicus*. **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 256-260, 2017.

KIHARA, M.; KOIKE, T.; IMAKURA, Y.; KIDA, K.; SHINGU, T.; KOBAYASHI, S. Alkaloidal constituents of *Hymenocallis rotata* HERB. (Amaryllidaceae). **Chem. Pharm. Bull.**, v. 35, n. 3, p. 1070-1075, 1987.

KILGORE, M. B.; KUTCHAN, T. M. The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme discovery. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 3, p. 317-337, 2016.

LIKHITWITAYAWUID K.; ANGERHOFER, C. K.; CHAL, H.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 8, p. 1331-1338, 1993.

LIU, Z. M.; HUANG, X. Y.; CUI, M. R.; ZHANG, X. D.; CHEN, Z.; YANG, B. S.; ZHAO, X. K. Amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *Lycoris radiata* with cytotoxic and anti-inflammatory activities. **Fitoterapia**, v. 101, p. 188-193, 2015.

LUO, Z.; WANG, F.; ZHANG, J.; LI, X.; ZHANG, M.; HAO, X.; XUE, Y.; LI, Y.; HORGAN, D.; YAO, G.; ZHANG, Y. Cytotoxic alkaloids from the whole plants of *Zephyranthes candida*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 12, p. 2113-2120, 2012.

MAELICKE, A.; SAMOCHOCKI, M.; JOSTOCK, R.; FEHRENBACHER, A.; LUDWIG, J.; ALBUQUERQUE, E. X.; ZERLIN, M. Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. **Biological Psychiatry**, v. 49, n. 3, p. 279-288, 2001.

MASI, M.; VAN DER WESTHUYZEN, A. E.; TABANCA, N.; EVIDENTE, M.; CIMMINO, A.; GREEN, I. R.; BERNIER, U. R.; BECNEL, J. J.; BLOOMQUIST, J. R.; VAN OTTERLO, W. A. L.; EVIDENTE, A. Sarniensine, a mesembrine-type alkaloid isolated from *Nerine sarniensis*, an indigenous South African Amaryllidaceae, with larvicidal and adulticidal activities against *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 116, p. 34-28, 2017.

MARTINELLI, G. Nota sobre *Worsleya rayneri* (J.D.Hooker) Traub & Moldenke, espécie ameaçada de extinção. **Rodriguésia**, n. 36, v. 58, p. 65-72, 1984. Disponível em: <<http://rodriguesia.jbrj.gov.br/FASCICULOS/Rodrig36-n58-1984/65-71%20worsleya.pdf>>. Acesso em: 05 mai. 2015.

MARTINELLI, G.; DE MORAES, M. D. Nota científica: Conservação e manejo de *Worsleya rayneri* (J.D.Hooker) Traub & Moldenke – resultados preliminares de projeto para recuperação de uma espécie criticamente ameaçada. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 1, p. 24-26, 2007. Disponível em: <<http://ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/viewFile/55/58>>. Acesso em: 24 mai. 2015.

MEEROW, A. W.; FAY, M. F.; GUY, C.L.; LI, Q. B.; ZAMAN, F. Q.; CHASE, M. W. Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid rbc-L and trnI-F sequence data. **American Journal of Botany**, v. 9, n. 86, p. 1325-1345, 1999. MCNULTY, J.; NAIR, J. J.; BASTIDA, J.; PANDEY, S.; GRIFFIN, C. Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: a potent inducer of apoptosis in human leukemia cells. **Phytochemistry**, v. 70, n. 7, p. 913-919, 2009.

MCNULTY, J.; NAIR, J. J.; CODINA, C.; BASTIDA, J.; PANDEY, S.; GERASIMOFF, J.; GRIFFIN, C. Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids. **Phytochemistry**, v. 68, n. 7, p. 1068 - 1074, 2007.

MCNULTY, J.; NAIR, J. J.; BASTIDA, J.; PANDEY, S.; GRIFFIN, C. Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: a potent inducer of apoptosis in human leukemia cells. **Phytochemistry**, v. 70, n. 7, p. 913 – 919, 2009.

MCNULTY, J.; NAIR, J. J.; LITTLE, J. R. L.; BRENNAN, J. D.; BASTIDA, J. Structure-activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 5290-5294, 2010.

MIYASAKA, K.; HIRAMATSU, Y. Pharmacological studies of lycorenine, an alkaloid of *Lycoris radiata* Herb.: II. Effects of blood pressure in rats and dogs and the mechanism of tachyphylaxis to the vasodepressor action of lycorenine in rats. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 30, n. 5, p. 655-664, 1980.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001. Disponível em: <<http://scielo.br/pdf/qn/v24n1/4457.pdf>>. Acesso em: 6 abr. 2015.

NAIR, J. J.; RÁROVÁ, L.; STRNAD, M.; BASTIDA, J.; VAN STADEN, J. Apoptosis-inducing effects of distichamine and narciprimine, rare alkaloids of the plant family

Amaryllidaceae. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 19, p. 6195-6199, 2012.

NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Acetylcholinesterase inhibition within the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. **Natural product communications**, v. 7, n. 7, p. 959-962, 2012.

NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Traditional usage, phytochemistry and pharmacology of the south african medicinal plant *Boophone disticha* (L.f.) Herb. (Amaryllidaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 12-26, 2014.

NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 6, p. 629-661, 2016.

NOZAKI, J. R.; KIM, T.; IMAKURA, Y.; KIHARA, M.; KABOYASHI, S. Effect of alkaloids isolated from Amaryllidaceae on herpes simplex virus. **Research in Virology**, v. 140, p. 115-128, 1989.

OLUYEMISI, O. O.; ORIABURE, A. E.; ADEKUNLE, A. J.; RAMSAY, K. S. T.; SHYYAULA, S.; CHOUDHARY, M. I. Bioassay-guided isolation of poliovirus-inhibiting constituents from *Zephyranthes candida*. **Pharmaceutical Biology**, v.53, n. 6, p.882-888, 2015.

ORTHOLAND, J. Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Current opinion in chemical biology**, v. 8, n. 3, p. 271-280, 2004.

OSORIO, E. J.; BERKOV, S.; BRUN, R.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; CABEZAS, F.; BASTIDA, J. *In vitro* antiprotozoal activity of alkaloids from *Phaedranassa dúbia* (Amaryllidaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 3, n. 3, p. 161-163, 2010.

REFAAT, J.; KAMEL, M. S.; RAMADAN, M. A.; ALI, A. A. Crinum, and endless source of bioactive principles: a review. Part I. Crinum alkaloids: lycorine-type alkaloids. **IJPSR**, v. 3, n. 7, p. 1883-1890, 2012.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRÍGUES, J. A.; LOYOLA, J. I.; ASTUDILLO, L.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Activity of Amaryllidaceae alkaloids on the blood pressure of normotensive rats. **Pharm. Pharmacol. Commun**, v. 6, p. 309-312, 2000.

SCHONES, H. K.; SMITH, D. H.; BURLINGAME, A. L. Mass spectra of Amaryllidaceae alkaloids: the lycorenine series. **Tetrahedron**, v. 24, p. 2825-2837, 1965.

ŞENER, B.; ORHAN, I.; SATAYAVIVAD, J. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p. 1220-1223, 2003.

SODRÉ, José Barbosa. ***Eucharis grandiflora***. 1999. 1 fotografia. Disponível em: <http://ceapdesign.com.br/familias_botanicas/amaryllidaceae.html>. Acesso em: 29 jul. 2016.

SODRÉ, José Barbosa. ***Griffinia espiritensis***. 1999. 1 fotografia. Disponível em: <http://ceapdesign.com.br/familias_botanicas/amaryllidaceae.html>. Acesso em: 29 jul. 2016.

SODRÉ, José Barbosa. ***Hippeastrum hybridum***. 1999. 1 fotografia. Disponível em: <http://ceapdesign.com.br/familias_botanicas/amaryllidaceae.html>. Acesso em: 29 jul. 2016.

SODRÉ, José Barbosa. ***Sternbergia lútea***. 1999. 1 fotografia. Disponível em: <http://ceapdesign.com.br/familias_botanicas/amaryllidaceae.html>. Acesso em: 29 jul. 2016.

SONG, J. H.; ZHANG, L.; SONG, Y. Alkaloids from *Lycoris aurea* and their cytotoxicities against the head and neck squamous cell carcinoma. **Fitoterapia**, v. 95, p. 121-126, 2014.

SOUZA, Susana. **Prancha botânica de *Worsleya procera* (Lem.) Traub**. 2012. Disponível em: <<http://susanafsouza.blogspot.com.br/>>. Acesso em: 03 ago. 2016.
SUAU, R.; GÓMEZ, A. I.; RICO, R. Isimine and related alkaloids from *Lapiedra martinezii*. *Phytochemistry*, v. 29, n. 5, p. 1710-1712, 1990.

SZLÁVIK, L.; GYURIS, A.; MINÁROVITS, J.; FORGO, P.; MOLNÁR, J.; HOHMANN, J. Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. **Planta medica**, v. 70, n. 9, p. 871-873, 2004.

TANKER, M.; ÇITOGLU, G.; GÜMÜHEL, B.; HENER, B. Alkaloids of *Sternbergia clusiana* and their analgesic effects. **Pharmaceutical Biology**, v. 34, n. 3, p. 194-197, 1996.

ÜNVER, N.; KAYA, G., I.; WERNER, C.; VERPOORTE, R.; GÖZLER, B. Galanthindole: a new indole alkaloid from *Galanthus plicatus* ssp. *byzantinus*. **Planta medica**, v. 69, n. 09, p. 869-871, 2003.

ÜNVER, N. New skeletons and new concepts in Amaryllidaceae alkaloids. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, n. 1, p. 125-135, 2007.

VERPOORTE, R.; ALFERMANN, A. W. **Metabolic engineering of plant secondary metabolism**. 1. ed. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000.

VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; TRIBO, G.; CODINA, C.; RUBIRALTA, M. Alkaloids from *Narcissus bicolor*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 1307-1310, 1990.

WANG, Y. H.; ZHANG, Z. K.; YANG, F. M.; SUN, Q. Y.; HE, H. P.; DI, Y. T.; MU, S. Z.; LU, Y.; CHANG, Y.; ZHENG, Q. T.; DING, M.; DONG, J. H.; HAO, X. J. Benzylphenethylamine alkaloids from *Hosta plantaginea* with inhibitory activity

against tobacco mosaic virus and acetylcholineesterase. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 9, p. 1458-1461, 2007.

WENIGER , B.; ITALIANO L.; BECK, J.P.; BASTIDA, J.; BERGOÑON, S.; CODINA, C.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. **Planta medica**, v. 61, n. 01, p. 77-79, 1995.

WINK, M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. **Theor. Appl. Genet.**, n. 75, p. 225-233, 1988.

YUNES R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES R. A.; CALIXTO J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó, Brasil:Argos, 2001, p. 18-44.